

Untersuchungen zur Generierung, Migration und Funktion von Regulatorischen T-Zellen in der Schwangerschaft

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Anne Leber, geb. Schumacher

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Hans-Dieter Volk
2. Prof. Dr. Ana Claudia Zenclussen
3. PD Dr. Barbara Tzschentke

Tag der mündlichen Prüfung: 19. September 2011

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	13
2	EINLEITUNG	18
2.1	Biologische Aspekte der menschlichen Schwangerschaft	18
2.1.1	Der Menstruationszyklus beim Menschen	18
2.1.2	Die frühe Schwangerschaft beim Menschen	19
2.1.3	Entwicklung und Morphologie der menschlichen Plazenta in der Frühschwangerschaft	20
2.1.3.1	Der villöse Trophoblast	21
2.1.3.2	Der extravillöse Trophoblast	22
2.1.3.3	Die reife menschliche Plazenta	22
2.2	Biologische Aspekte der Mausschwangerschaft	23
2.2.1	Der Estruszyklus bei der Maus	23
2.2.2	Die frühe Schwangerschaft bei der Maus	24
2.2.3	Entwicklung und Morphologie der Mausplazenta	26
2.3	Plazentatypen	28
2.4	Komplikationen in der Schwangerschaft	29
2.4.1	Definition und Epidemiologie des Abortes	29
2.4.2	Abortursachen	30
2.4.3	Das immunologische Mausabortmodell	31
2.5	Immunologie der Schwangerschaft beim Menschen und bei der Maus	32

2.5.1	Paradoxon der Schwangerschaft	32
2.5.2	Überlebensstrategien des Feten im Uterus der Mutter	32
2.5.3	Zelluläre Mechanismen der Mutter zum Schutz des Feten	33
2.5.3.1	Zellen des angeborenen Immunsystems	33
2.5.3.2	Zellen des adaptiven Immunsystems	35
2.5.4	Immunregulierende Moleküle während der Schwangerschaft	36
2.6	CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Regulatorische T-Zellen	37
2.6.1	Phänotyp und Subtypen von regulatorischen T-Zellen	38
2.6.2	Der Transkriptionsfaktor Foxp3 als spezifischer Marker für Maus-T _{reg} -Zellen	40
2.6.3	Entstehung der T _{reg} -Zellen im Thymus und in der Peripherie	40
2.6.3.1	Einfluss von Dendritischen Zellen und Zytokinen auf die T _{reg} -Zellentstehung	42
2.6.4	Funktionen der T _{reg} -Zellen	43
2.7	Die Rolle von CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T_{reg}-Zellen für die Etablierung und den Verlauf der Schwangerschaft	45
2.7.1	T _{reg} -Zellen in der Schwangerschaft bei Mensch und Maus	45
2.7.2	Generierung und Antigenspezifität von T _{reg} -Zellen in der Schwangerschaft	46
2.7.3	Adoptiver Transfer von T _{reg} -Zellen in das immunologische Abortmodell	48
2.7.4	Mechanismen der T _{reg} -Zellen in der Schwangerschaft beim Menschen und bei der Maus	49
2.8	Humanes Choriongonadotropin in der Schwangerschaft	50
2.8.1	Struktur, Vorkommen und Rezeptorbindung	50
2.8.2	Implantatorische und angiogenetische Funktionen des hCG	53

2.8.3	Immunregulatorische Funktionen des hCG	54
2.9	Zielstellung	55
3	MATERIAL UND METHODEN	57
3.1	Materialien	57
3.1.1	Allgemeine Laborausstattung	57
3.1.2	Computerprogramme	58
3.1.3	Geräte und Materialien für Zellkultur	58
3.1.4	Geräte und Materialien für magnetische Zellsortierung	59
3.1.5	Geräte und Materialien für molekularbiologische Methoden	59
3.1.6	Geräte und Materialien für Durchflusszytometrie	60
3.1.7	Geräte und Materialien für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz	60
3.1.8	Chemikalien und Lösungen	61
3.1.9	Medien und Pufferlösungen	62
3.1.10	Enzyme, Proteine, Nukleinsäuren und andere biologisch aktive Substanzen	65
3.1.11	Antikörper	66
3.1.12	Primer	67
3.1.13	Expressionsvektoren	68
3.1.14	Kits	68
3.1.15	Primäre Zellen und Zelllinien	68

3.1.16	Tierstämme und Tierhaltung	69
3.2	Methoden	70
3.2.1	Versuchsteil I: Untersuchungen zur Expansion der T_{reg} -Zellen vor der Schwangerschaft	70
3.2.1.1	Gewinnung von Vaginalflüssigkeit zur Bestimmung des Zyklusstadiums	70
3.2.1.2	Bestimmung der Anzahl an T_{reg} -Zellen während des Estruszyklus in der Maus	70
3.2.2	Versuchsteil II: Untersuchungen zur Expansion der T_{reg} -Zellen während der frühen Schwangerschaft	70
3.2.2.1	Verpaarung der Mäuse	70
3.2.2.2	Bestimmung des Einflusses von Bestandteilen des Ejakulats auf die Expansion von T_{reg} -Zellen	71
3.2.2.3	Gewinnung von Samenblasenflüssigkeit	72
3.2.2.4	Proteinkonzentrationsbestimmung in der Samenblasenflüssigkeit	72
3.2.2.5	<i>In vitro</i> -Behandlung von T_{reg} -Zellen und T-Effektorzellen mit Samenblasenflüssigkeit oder rekombinanten Molekülen	72
3.2.2.6	Gewinnung von Blutplasma für die Bestimmung des Progesterongehaltes	73
3.2.2.7	Chemilumineszenz Immunoassay (CLIA)	73
3.2.2.7.1	Progesteronbestimmung mittels Lumineszenz	73
3.2.3	Versuchsteil III: Einfluss des Schwangerschaftshormons Choriongonadotropin auf die Generierung, Migration und Funktion von T_{reg} -Zellen unter Verwendung von menschlichen Proben	74
3.2.3.1	Entnahme von Humanproben	74
3.2.3.2	Isolierung von menschlichen primären Trophoblastenzellen	75
3.2.3.3	Einfrieren und Auftauen von primären Zellen und Zelllinien	75

3.2.3.4	Gewinnung von $CD4^+CD25^+T_{reg}$ -Zellen und $CD4^+CD25^-$ T-Zellen mittels MACS [®]	76
3.2.3.4.1	Isolierung von $CD4^+CD25^+T_{reg}$ -Zellen und $CD4^+CD25^-$ T-Zellen aus menschlichem Blut	77
3.2.3.4.2	Ausbeute und Reinheit der $CD4^+CD25^+T_{reg}$ -Zellen	77
3.2.3.5	Transfektion von HCT116-Zellen mit hCG-Vektoren	77
3.2.3.6	Behandlung von JEG-3-Zellen mit hCG-siRNA	78
3.2.3.7	Migrationsassay unter Verwendung des Transwell-Systems	78
3.2.3.8	Migrationsassay unter Verwendung einer 3D-Kollagenmatrix und computerunterstützte Verfolgung von Zellen	80
3.2.3.9	<i>In vitro</i> Assay zur Bestimmung der Konvertierung von humanen $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ T-Zellen in humane $CD4^+CD25^+Foxp3^+T_{reg}$ -Zellen	80
3.2.3.10	Methoden zur Aufbereitung von immunologischen Färbungen	80
3.2.3.10.1	Paraffineinbettung	81
3.2.3.10.2	Paraffinschnitte	81
3.2.3.10.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	82
3.2.3.11	Immunhistochemische Methoden	82
3.2.3.11.1	Zytokeratin- und hCG-Färbung	82
3.2.3.11.2	Auswertung der immunhistochemischen Färbung	84
3.2.3.12	Immunfluoreszenzfärbung	84
3.2.3.12.1	Färbung des LH/CG-Rezeptors	84
3.2.3.13	Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	85

3.2.3.13.1	ELISA zum Nachweis von β -hCG	85
3.2.4	Versuchsteil III: Einfluss des Schwangerschaftshormons Choriongonadotropin auf die Generierung und Migration von T_{reg} -Zellen unter Verwendung von Mausproben	86
3.2.4.1	Bestimmung des Einflusses des hCG auf die Expansion von T_{reg} -Zellen	86
3.2.4.2	Anästhesie und retro-orbitale Blutentnahme	87
3.2.4.3	Präparation und Probennahme	87
3.2.4.4	Isolierung von Lymphozyten aus dem Blut	88
3.2.4.5	Isolierung von Lymphozyten aus Milz, Thymus und Lymphknoten	89
3.2.4.6	Isolierung von Lymphozyten aus Uterus und Dezidua	89
3.2.4.7	Isolierung von $CD4^{+}CD25^{+} T_{reg}$ -Zellen und $CD4^{+}CD25^{-}$ T-Zellen aus Mausgewebe	90
3.2.4.8	Gemischte Leukozyten Reaktion (Mixed Leucocyte Reaction, MLR)	90
3.2.4.9	Gewinnung von APZ aus DBA/2J-Männchen zur Aktivierung von $CD4^{+}CD25^{-}$ T-Zellen	90
3.2.4.10	Isolierung von $CD4^{+}CD25^{+} T_{reg}$ -Zellen und $CD4^{+}CD25^{-}$ T-Zellen	91
3.2.4.11	Messung der Lymphozytenproliferation mittels CFDA-SE	91
3.2.4.12	Kokultur von APZ, T_{reg} -Zellen und $CD4^{+}CD25^{-}$ T-Zellen	92
3.2.4.13	Gewinnung von Milz- und Deziduazellen mittels enzymatischen Verdau	93
3.2.4.14	Isolierung von $CD11c^{+}$ -Zellen aus Milz und Dezidua sowie $CD4^{+}$ T-Zellen aus lokalen Lymphknoten mittels MACS [®]	94
3.2.4.15	Kokultur von $CD11c^{+}$ - Zellen mit $CD4^{+}$ T-Zellen	94
3.2.4.16	Durchflusszytometrie	95

3.2.4.16.1	Extrazelluläre Färbung, Fixierung und intrazelluläre Färbung von Lymphozyten	97
3.2.4.16.2	Auswertung der Durchflusszytometrie	99
3.2.4.17	Molekularbiologische Methoden	101
3.2.4.17.1	Isolierung von RNA	101
3.2.4.17.2	Photometrische Mengenbestimmung	102
3.2.4.17.3	Herstellung von cDNA mittels reverser Transkription aus mRNA	102
3.2.4.17.4	Real-time- (Echtzeit) PCR	102
3.2.4.17.4.1	Durchführung der RT-PCR nach dem Taqman-Prinzip	104
3.2.4.17.4.2	Durchführung der RT-PCR unter Verwendung von SYBR-Green	105
3.2.4.17.4.3	Auswertung der RT-PCR	107
3.2.4.18	Statistik	107
4	ERGEBNISSE	109
4.1	Versuchskomplex I: Untersuchungen zur Expansion der T_{reg}-Zellen vor der Schwangerschaft	109
4.1.1	Die Anzahl an T _{reg} -Zellen ist während der rezeptiven Phase des Estruszyklus erhöht	109
4.2	Versuchskomplex II: Untersuchungen zur Expansion der T_{reg}-Zellen während der frühen Schwangerschaft	111
4.2.1	Untersuchungen zur <i>in vivo</i> Expansion der T _{reg} -Zellen in der frühen Schwangerschaft	111
4.2.1.1	Das Vorhandensein von Spermien und Samenblasenflüssigkeit im Ejakulat ist essentiell für den Anstieg von T _{reg} -Zellen im Thymus	113
4.2.1.2	Das Vorhandensein der Samenblasenflüssigkeit, aber nicht der Spermien, ist entscheidend für den Anstieg der T _{reg} -Zellen in lokalen Lymphknoten	114

4.2.2	Untersuchung zur Expansion der T _{reg} -Zellen nach <i>in vitro</i> Behandlung mit Samenblasenflüssigkeit	115
4.2.2.1	Die Behandlung mit allogener Samenblasenflüssigkeit bewirkt eine Expansion der T _{reg} -Zellen, die durch Blockierung von TGF-β1 gehemmt werden kann	116
4.2.2.2	Die Behandlung mit syngener Samenblasenflüssigkeit hat keinen signifikanten Einfluss auf die Expansion der T _{reg} -Zellen	118
4.2.2.3	Die <i>in vitro</i> Behandlung mit rekombinantem TGF-β1 verursacht eine Expansion von T _{reg} -Zellen aus BALB/c-Weibchen, jedoch nicht aus CBA/J-Weibchen	120
4.3	Versuchskomplex III: Einfluss des Schwangerschaftshormons Choriongonadotropin auf die Generierung, Migration und Funktion von T_{reg}-Zellen – Untersuchungen im Menschen	123
4.3.1	Untersuchung der fetal-mütterlichen Grenzfläche beim Menschen während der frühen Schwangerschaft	123
4.3.2	Die hCG mRNA-Expression ist in Gewebeproben von Patientinnen mit Spontanabort oder extrauteriner Schwangerschaft im Vergleich zu normal schwangeren Frauen in der frühen Schwangerschaft signifikant verringert	124
4.3.3	Die hCG Proteinmenge ist in Gewebeproben von Patientinnen mit Spontanabort oder extrauteriner Schwangerschaft im Vergleich zu normal schwangeren Frauen signifikant vermindert	125
4.3.4	Patientinnen mit Spontanabort oder extrauteriner Schwangerschaft weisen verminderte Mengen an T _{reg} -Zellen im Vergleich zu normal schwangeren Frauen an der fetal-mütterlichen Grenzfläche auf	129
4.3.5	Die Expression von hCG korreliert mit der foxp3-Expression an der fetal-mütterlichen Grenzfläche	130
4.3.6	Die Funktion von T _{reg} -Zellen ist in Patientinnen mit Schwangerschaftskomplikationen im Vergleich zu normal schwangeren Frauen an der fetal-mütterlichen Grenzfläche beeinträchtigt	130
4.3.7	Der LH/CG-Rezeptor ist auf T _{reg} -Zellen exprimiert	131
4.3.8	HCG-produzierende Primärtrophoblasten und JEG-3-Zellen bewirken die Migration von T _{reg} -Zellen	133
4.3.9	Transiente hCG-Expression von HCT116-Zellen begünstigt die Migration der T _{reg} -Zellen	136

4.3.10	Die nicht-hCG-produzierende Keratinozytzelllinie HaCat ist nicht in der Lage T _{reg} -Zellen anzulocken	138
4.3.11	Die siRNA-Behandlung von JEG-3-Zellen resultiert in einer Abnahme der Migrationsrate der T _{reg} -Zellen	140
4.3.12	HCG bewirkt eine Konvertierung von CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen in T _{reg} -Zellen	141
4.4	Versuchskomplex III: Einfluss des Schwangerschaftshormons Choriongonadotropin auf die Generierung, Migration und Funktion von T_{reg}-Zellen – Untersuchungen im Maussystem	143
4.4.1	Die Abortrate der Abortverpaarung CBA/J x DBA/2J ist gegenüber der Normalschwangerschaftsverpaarung CBA/J x BALB/c signifikant erhöht	145
4.4.2	Makroskopische Untersuchungen der fetal-mütterlichen Grenzfläche zeigen Unterschiede zwischen Abort- und Normalverpaarung	145
4.4.3	Die <i>in vivo</i> Behandlung von Abortmäusen mit hCG konnte die Abortrate signifikant senken	146
4.4.4	Die <i>in vivo</i> Behandlung mit hCG bewirkte eine Expansion von T _{reg} -Zellen im Thymus	148
4.4.5	Die <i>in vivo</i> Behandlung mit hCG führt zur Expansion der T _{reg} -Zellen in den lokalen Lymphknoten und in der Peripherie	149
4.4.6	HCG führt zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl an T _{reg} -Zellen direkt an der fetal-mütterlichen Grenzfläche	151
4.4.7	Untersuchung des Effektes der <i>in vivo</i> Behandlung von hCG auf die totale Anzahl an CD11c ⁺ -Zellen und deren Reifezustand in der Milz und der Dezidua	153
4.4.7.1	Die <i>in vivo</i> Behandlung mit hCG hat keinen Einfluss auf die Anzahl an CD11c ⁺ -Zellen in der Milz	154
4.4.7.2	Die <i>in vivo</i> Behandlung mit hCG kann die Anzahl an CD11c ⁺ MHCII ⁺ - und CD11c ⁺ CD80 ⁺ -Zellen in der Milz nur leicht reduzieren	155
4.4.7.3	Die <i>in vivo</i> Behandlung mit hCG kann die Expression von MHCII und CD80 in CD11c ⁺ -Zellen in der Milz nicht beeinflussen	156

4.4.7.4	Die <i>in vivo</i> Behandlung mit hCG führt zu einer signifikanten Reduktion in der Anzahl an CD11c ⁺ -Zellen in der Dezidua	156
4.4.7.5	Die <i>in vivo</i> Behandlung mit hCG kann die Anzahl an CD11c ⁺ MHCII ⁺ - und CD11c ⁺ CD80 ⁺ -Zellen in der Dezidua deutlich reduzieren	157
4.4.7.6	Die <i>in vivo</i> Behandlung mit hCG kann die Expression von CD80, jedoch nicht von MHCII in CD11c ⁺ -Zellen in der Dezidua deutlich reduzieren	158
4.4.8	Die Expansion von T _{reg} -Zellen wird durch deziduale CD11c ⁺ -Zellen, jedoch nicht durch CD11c ⁺ -Zellen aus der Milz vermittelt	159
4.4.9	Die <i>in vivo</i> Applikation von hCG steigert die Suppressivität von T _{reg} -Zellen aus Milz und Lymphknoten, jedoch nicht von thymalen T _{reg} -Zellen	161
5	DISKUSSION	165
5.1	Der beobachtete Anstieg an T _{reg} -Zellen zum Zeitpunkt der Empfängnis kann als Vorbereitung auf eine mögliche Schwangerschaft angesehen werden	166
5.2	Bestandteile des Ejakulats bedingen einen Anstieg an antigenspezifischen T _{reg} -Zellen in der frühen Schwangerschaft	167
5.3	Das in der Samenblasenflüssigkeit enthaltene anti-inflammatorische Zytokin TGF-β begünstigt die Expansion der T _{reg} -Zellen	170
5.4	Die Expression von hCG und T _{reg} -Zellmarkern an der fetal-mütterlichen Grenzfläche korreliert mit einem erfolgreichen Schwangerschaftsverlauf	174
5.5	HCG bewirkt die Migration der T _{reg} -Zellen zu Trophoblastenzellen	176
5.6	Das von Trophoblasten sezernierte hCG bewirkt eine <i>de novo</i> Generierung von T _{reg} -Zellen aus naiven T-Zellen	178
5.7	Die fetale Abstoßung im Mausabortmodell kann durch eine hCG-vermittelte Erhöhung der T _{reg} -Zellanzahl verhindert werden	179

5.8	HCG induziert einen tolerogenen Phänotyp in Dendritischen Zellen und begünstigt somit eine Expansion der T_{reg}-Zellen	181
5.9	HCG erhöht die suppressive Kapazität von T_{reg}-Zellen	182
5.10	Zusammenfassung und Ausblick	185
6	ZUSAMMENFASSUNG	186
7	SUMMARY	187
8	LITERATUR	188
9	ANHANG	224
10	DANKSAGUNG	227
11	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	229

1 Abkürzungsverzeichnis

AAK	Asymmetrischer Antikörper
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbazol
AF	Alexa Fluor
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
cAMP	cyclic Adenosine MonoPhosphate (zyklisches Adenosinmonophosphat)
CD	Cluster of Differentiation (Differenzierungsmuster)
CFDA-SE	Carboxyfluoresceindiacetatsuccinimidylester
CLIA	Chemilumineszenz Immunoassay
CoPPIX	Cobaltprotoporphyrin
CsA	Cyclosporin A
C _T	Threshold Cycle (Schwellenwert)
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4 (Zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4)
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Di-Methyl-Sulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	1,4-Dithio-DL-Threitol
DZ	Dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EGF	Epidermal Growth Factor (Epidermaler Wachstumsfaktor)
ELISA	Enzym-Linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (Fluoreszenz-basierte Zellsortierung)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
Foxp3	Forkhead Box Protein 3
FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht)
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
GFP	Green Fluorescent Protein (Grün-fluoreszierendes Protein)
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor)
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormon (Gonadotropin-freisetzendes Hormon)
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
hCG	humanes Choriongonadotropin
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HO-1	Hämoxygenase 1
hPl	humanes Plazentalaktogen
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN- γ	Interferon- γ
IGF-1	Insulin-like Growth Factor (Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor)
IL	Interleukin
IPEX	X-chromosomal bedingtes Syndrom, assoziiert mit Störungen des Immunsystems, Polyendokrinopathie und Enteropathie
IVF	<i>In Vitro</i> Fertilization
LAG-3	Lymphocyte Activation Gen-3 (Lymphozyten-Aktivierungsgen 3)

LH	Luteinisierendes Hormon
LIA	Lumineszenz Immunoassay
LIF	Leukämie-inhibierender Faktor
LK	Lymphknoten
LSM	Lymphozyten-Separationsmedium
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting (Magnetische Zellsortierung)
Mcpt	Mast cell protease (Mastzellprotease)
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor (Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor)
MEM	Minimum Essential Medium
MHC	Major Histocompatibility Complex (Hauptgewebeverträglichkeitskomplex)
MLR	Mixed Leucocyte Reaction (gemischte Leukozytenreaktion)
M-MLV	Moloney-Murine Leukemia Virus (Moloney Maus-Leukämievirus)
MMP	Matrixmetalloproteinase
MZ	Mastzelle
NK	Natürliche Killerzelle
Nrp-1	Neuropilin 1
NTC	Non Template Control (Negativkontrolle)
odT	Oligodesoxythymidinnukleotid
PBS	Phosphat Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PD-1	Programmed Death-1 (Programmierter Zelltod 1)
PDL-1	Programmed Death Ligand-1 (Programmierter Zelltod Ligand 1)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PGE ₂	Prostaglandin E ₂

PKA	Proteinkinase A
P/S	Penicillin/Streptomycin
RIU	Relative Lumineszenzeinheit
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
rTGF- β	rekombinantes TGF- β
RT-PCR	Real-time Polymerase Chain Reaction (Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion)
SBF	Samenblasenflüssigkeit
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat (Natriumdodecylsulfat)
SSC	Sideward Scatter (Seitwärtsstreulicht)
SSW	Schwangerschaftswoche
TBS	Tris Buffered Saline (Tris-gepufferte Salzlösung)
T _{eff}	Effektor T-Zelle
TGF- β	Transforming Growth Factor- β (Transformierender Wachstumsfaktor β)
Th3-Zelle	T-Helferzelle 3
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (Gewebeinhibitor von Metalloproteinasen)
T _m	Schmelztemperatur
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α (Tumor-Nekrosefaktor α)
T _{reg} -Zelle	Regulatorische T-Zelle
Tr1-Zelle	Typ 1 regulatorische T-Zelle
TSH	Thyroid-stimulierendes Hormon
TZR	T-Zellrezeptor
ÜN	über Nacht
uNK	uterine Natürliche Killerzelle

uPA	Urokinase-Plasminogenaktivator
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
ZnPPIX	Zinkprotoporphyrin

2 Einleitung

2.1 Biologische Aspekte der menschlichen Schwangerschaft

2.1.1 Der Menstruationszyklus beim Menschen

Der normale Menstruationszyklus beim Menschen hat eine Länge von 28 ± 3 Tagen. Die erste Zyklushälfte (Proliferationsphase) beginnt mit dem ersten Tag der Menstruation und steht im Wesentlichen unter dem Einfluss des Follikel-stimulierenden Hormons (FSH), dessen Bildung durch die hypothalamische Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)-Ausschüttung stimuliert wird (Abb. 1). Unter der Stimulation von FSH beginnt im Eierstock die Follikelreifung, wobei der sich am weitesten entwickelnde Follikel überlebt. Die Follikelentwicklung verläuft dabei über die Stadien des Sekundär- und Tertiärfollikels zum Graaf-Follikel (Abb. 1). Simultan zur Follikelreifung erfolgt unter dem Einfluss der Östrogene eine Proliferation des Endometriums. Daher nimmt das Endometrium in der Proliferationsphase sichtbar an Dicke zu. Kurz vor dem Eisprung steigt der Östrogenspiegel stark an. Der Anstieg führt zu einer sprunghaften Erhöhung des Luteinsierenden Hormons (LH) und löst zusammen mit dem bereits ansteigenden Progesteronwert den Eisprung aus (Abb. 1). Die zweite Zyklushälfte (Lutealphase) beginnt mit dem Tag des Eisprungs. Nachdem sich der Graaf-Follikel geöffnet und die Eizelle an den Eileiter übergeben hat, entwickeln sich die im Eierstock verbliebenen Zellen des Follikels zu einer temporären endokrinen Drüse, dem *Corpus luteum* (Gelbkörper). Östradiol und Progesteron bewirken zusammen im Folgenden ein Absinken der FSH-Konzentration im Blut, die erst mit Nachlassen der Gelbkörperfunktion wieder ansteigt. Im Falle einer Befruchtung der Eizelle wird vom Trophoblasten humanes Choriongonadotropin (hCG) gebildet, welches die Funktion des Gelbkörpers aufrechterhält. Wird die Eizelle nicht befruchtet, beträgt die Lebensdauer des Gelbkörpers genau 14 Tage. Danach wird es atretisch und stellt die Hormonsynthese ein. Es wird dann *Corpus albicans* genannt (Abb. 1). Östrogene und Progesteron sinken sehr schnell auf ein basales Niveau ab. Unter dem Einfluss von Progesteron kommt es zudem in der zweiten Zyklushälfte zur sekretorischen Umwandlung des Endometriums. Ferner entwickeln sich die für die Progesteronwirkung charakteristischen Spiralarterien. Mit Nachlassen der Gelbkörperfunktion kommt es zur Regression des Endometriums und schließlich zur Konstriktion der Spiralarterien und somit zur Desquamation des Endometriums mit Einsetzen der Menstruation. Die Regelblutung ist somit ein Zeichen für die ausgebliebene Konzeption. Auf die Desquamationsphase folgt die Regeneration des Endometriums^[1].

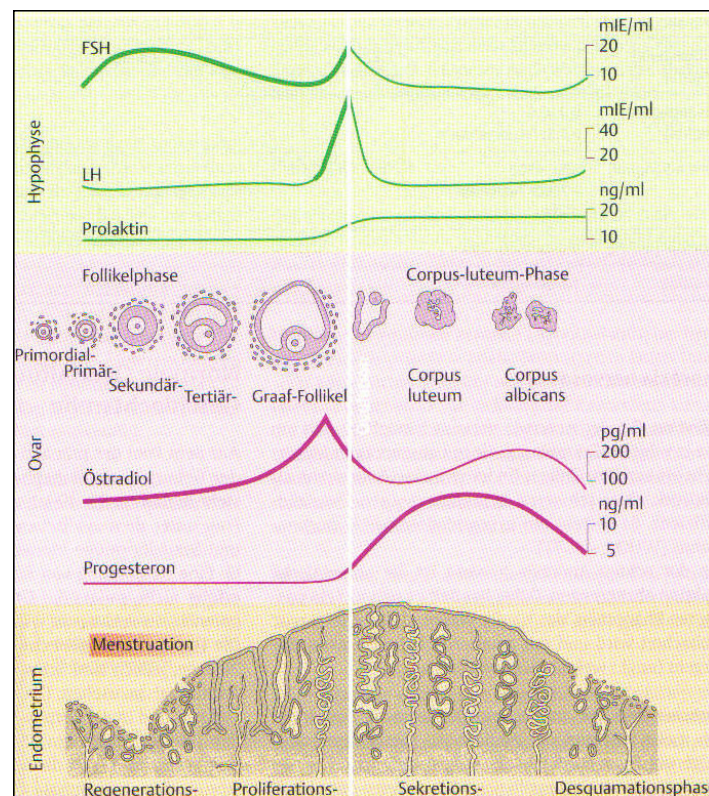


Abb. 1: Darstellung des Menstruationszyklus beim Menschen. In der ersten Zyklushälfte (Proliferationsphase) bewirken das Follikel-stimulierende Hormon (FSH) und Östrogene die Follikelreifung und den Aufbau der Gebärmutter Schleimhaut. Das Luteinisierende Hormon (LH) und Progesteron lösen den Eisprung aus, bei dem die Eizelle aus dem Graaf-Follikel entlassen und an den Eileiter übergeben wird. Nach dem Eisprung bilden die im Eierstock verbliebenen Follikelzellen das *Corpus luteum* (Gelbkörper), das im Falle einer Befruchtung die Progesteronproduktion aufrechterhält. Wird die Eizelle nicht befruchtet, bildet sich das *Corpus luteum* zum *Corpus albicans* zurück. Die Gebärmutter Schleimhaut wird abgebaut und es kommt zum Einsetzen der Regelblutung. Abbildung entnommen aus Literaturangabe^[1].

2.1.2 Die frühe Schwangerschaft beim Menschen

Die normale Schwangerschaft beim Menschen dauert 40 Wochen und wird in drei Trimenen unterteilt. Sie beginnt mit der Fertilisation der Oozyte durch das Spermium. Nach Vereinigung des mütterlichen und väterlichen Zellkerns teilt sich die Zygote mehrfach, während sie durch den Eileiter zum Uterus wandert. Zwischen Eisprung (Ovulation) und Ankunft des befruchteten Eies im Uterus vergehen 4-5 Tage. Nach 3 Tagen spricht man von der Morula (8-16 Zellen), die durch weitere Zellteilungen zur Blastozyste wird. Die Blastozyste besteht aus dem Embryoblast und den ihn umgebenden Trophoblasten.

ten und nistet sich am Tag 6-7 nach der Befruchtung (rezeptive Phase) in das mütterliche Endometrium ein. Während dieser Phase kommt es im Uterus zum strukturellen und funktionellen Umbau der Epithel- und Stromazellen des Endometriums, was als Dezidualisierung bezeichnet wird. Der Prozess der Dezidualisierung ist durch das Wachstum und die Matrixproduktion der Stromazellen gekennzeichnet und wird im Wesentlichen durch die Steroidhormone Östrogen und Progesteron sowie durch Wachstumshormone und Zytokine beeinflusst^[2].

2.1.3 Entwicklung und Morphologie der menschlichen Plazenta in der Frühschwangerschaft

Während der Einnistung (Implantation, Nidation) dringt der invasive Trophoblast in das mütterliche Endometrium, das jetzt als Dezidua bezeichnet wird, vor (Abb. 2). Die Kontaktzone der Plazenta (fetal-er Anteil) mit der Dezidua (mütterlicher Anteil) wird von einer kontinuierlichen Schicht von Trophoblasten, dem primitiven Synzytium, gebildet, das auf Grund seiner invasiven Eigenschaften für die Implantation der Blastozyste in die Dezidua sorgt. In der Folge kommt es zu einer massiven Proliferation der Zytotrophoblasten und durch Zellfusion zu einer weiteren Ausdehnung des Synzytiums, in dem Hohlräume, sog. Lakunen, entstehen. Zwischen den Lakunen bilden sich durch vermehrtes Wachstum und durch Migration von Zytotrophoblasten in das Synzytium die Primärzotten, die ausschließlich aus Trophoblastenzellen bestehen. Einzelne Plazentazotten (Haftzotten) haften im Bereich der Kontaktzone am Endometrium und stellen die Verankerung in der Uteruswand sicher (Abb.2). Die Primärzotten wandeln sich im Verlauf der Schwangerschaft (4.-5. Schwangerschaftswoche (SSW)) in Sekundärzotten mit bindegewebsartigem Stroma um. Die Neubildung von Blutgefäßen ab der 5.-6. SSW ist das wesentliche Merkmal der Weiterentwicklung von Sekundär- zu Tertiärzotten. Die Lakunen verschmelzen zum intervillösen Raum, der allerdings erst ab der 10.-11. SSW aus den zuführenden uterinen Spiralarterien mit mütterlichem Blut, das die frei schwimmenden Zotten umspült, gefüllt wird. In den Zotten der sich entwickelnden Plazenta befinden sich unreife, zytotrophoblastäre Stammzellen, die für die Ausbildung der beiden wichtigsten funktionellen Bestandteile der Plazenta verantwortlich sind, der villöse und der extravillöse Trophoblast^[2].

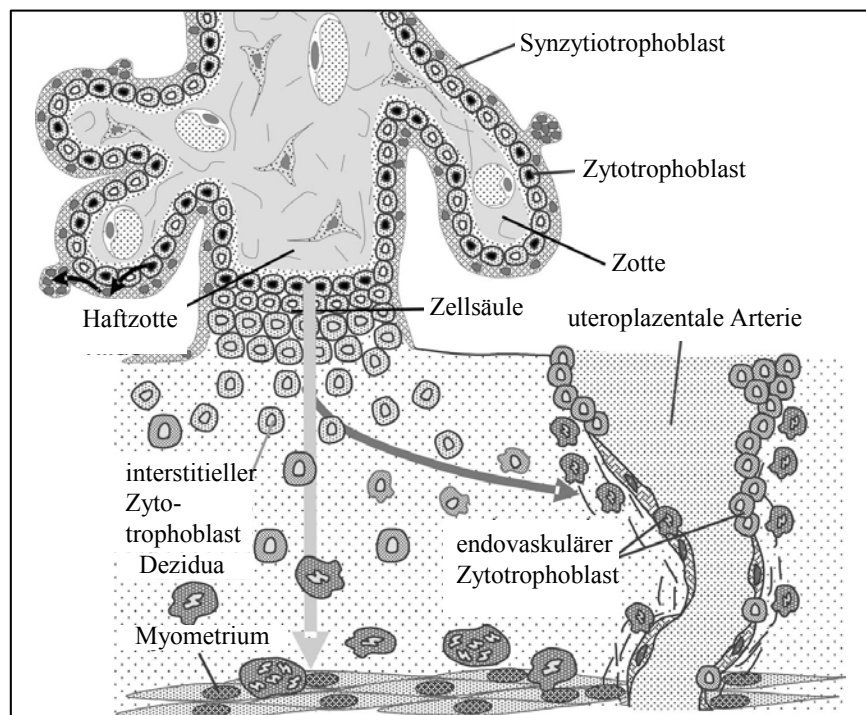


Abb. 2: Darstellung der Einnistung des Trophoblasten (fetalen Anteil) in die Dezidua (mütterlichen Anteil). Invasive Zytotrophoblastzellen dringen in die Dezidua vor und ersetzen als endovaskuläre Zytotrophoblastzellen die Endothelzellen in den mütterlichen Spiralarterien. Abbildung entnommen und modifiziert aus Literaturangabe^[3].

2.1.3.1 Der villöse Trophoblast

Der villöse Trophoblast bildet den zweischichtigen Zottenüberzug, bestehend aus Zytotrophoblastzellen und dem äußeren Synzytiotrophoblasten, der durch Verschmelzung der darunter liegenden einkernigen Zellen mit dem Synzytium gebildet und ständig erneuert wird (Abb. 2)^{[4][5]}. Das villöse Synzytium ist speziell für die Synthese des Schwangerschaftshormons hCG oder des humanen Plazentalaktogens (hPL), sowie auch für Transportvorgänge von Gasen und Nährstoffen aus dem mütterlichen Blut in die Kapillaren der fetalen Zotte ausgestattet. Während in den ersten Wochen der Schwangerschaft der Zottenüberzug kontinuierlich aus zweireihigem Trophoblastepithel besteht, wird die Außenschicht der reifen Endzotten vor allem vom Synzytium mit nur noch vereinzelt nachweisbaren Zytotrophoblastzellen gebildet^[2].

2.1.3.2 Der extravillöse Trophoblast

An der Haftstelle der Zotten mit der uterinen Basalmembran erfahren die Stammzellen des Trophoblasten einen starken proliferativen Reiz. Die sich rasch vermehrenden extravillösen Trophoblastzellen bilden Trophoblastzellsäulen, die tief in die Dezidua vordringen (Abb. 2). Gleichzeitig wandern endovaskuläre Trophoblastzellen in die Arterien und Venen der Dezidua ein und breiten sich auf Grund der Verdrängung des Endothels intravasal entlang der Gefäße aus. Die Gefäße erfahren dabei einen vollständigen Umbau ihrer Wandstruktur, bei dem die Endothelzellen durch Trophoblastzellen ersetzt werden (Abb.2). Durch den Verlust dieser für die Gefäßregulation entscheidenden Elemente entwickeln sich aus den englumigen Spiralarterien des nichtschwangeren Uterus weite Schläuche, die sowohl die dezidualen als auch die deziduanahen myometrialen Gefäßabschnitte umfassen. Der Abfall des Gefäßwiderstandes in der Peripherie des uterinen Kreislaufs ist Voraussetzung für die dramatische Steigerung des Zustroms mütterlichen Blutes in die Plazenta. Bei der Invasion von Trophoblastzellen in die Gefäße sowie in die extrazelluläre Matrix der Dezidua spielt die Expression von Adhäsionsmolekülen eine wichtige Rolle. Auch die Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen (MMP) oder Urokinase-Plasminogenaktivatoren (uPA) sind für den Vorgang der Migration von großer Bedeutung^[6]. Eine unzureichende Trophoblastinvasion und Umwandlung der Spiralarterien können zu einer Reihe von Schwangerschaftskomplikationen wie Fehlgeburt oder Präeklampsie führen^[2].

2.1.3.3 Die reife menschliche Plazenta

Die reife Plazenta besteht aus der dem Uterus zugewandten Basalplatte (mütterlicher Anteil) und der gegenüberliegenden Chorionplatte (fetaler Anteil) (Abb. 3). Die Chorionplatte besteht aus den beiden Fruchthüllen (Amnion und Chorion) sowie den fetalen Gefäßen und dem Nabelschnuransatz. An der Chorionplatte gibt es weißliche kuglige Gebilde, bei denen es sich um Zellinseln handelt. Zwischen der Chorionplatte und der Basalplatte befindet sich der intervilliöse Raum mit den Chorionzotten. Die Zotten gehören zu Zottenbäumen (fetale Kotyledonen). Jeder Zottenbaum ist mit seinem Zottenstamm an der Chorionplatte und mit einer Haftzotte an der Basalplatte und den Septen befestigt. Darüber hinaus sind die Zotten auch untereinander und mit Nachbarkotyledonen verbunden. Zwischen den Zotten strömt intravital das an der Oberfläche der Basalplatte aus den Öffnungen der mütterlichen Gefäße austretende Blut entlang. Aus der Basalplatte ragen stellenweise weißliche, teils säulenförmige, teils plattenförmige Vorwölbungen in den intervilliösen Raum, die sog. Zellsäulen, die hauptsächlich aus Zytotrophoblastzellen bestehen (Abb. 3)^[7].

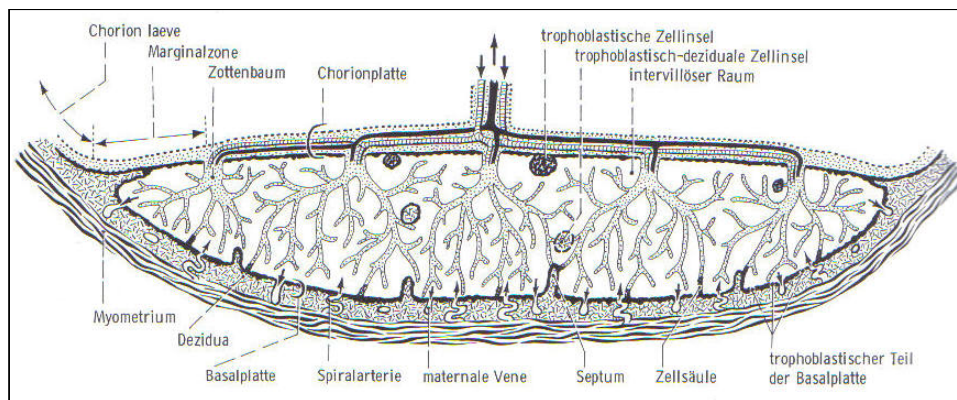


Abb. 3: Darstellung der reifen Plazenta. Die Plazenta unterteilt sich in den fetalen Anteil (Chorionplatte) und den mütterlichen Anteil (Basalplatte). Zwischen beiden Platten befindet sich der intervillöse Raum mit den Chorionzotten. Abbildung entnommen aus Literaturangabe^[7].

2.2 Biologische Aspekte der Mausschwangerschaft

2.2.1 Der Estruszyklus bei der Maus

Der Estruszyklus bei der Maus dauert vier bis sechs Tage und lässt sich in vier Stadien unterteilen: Diestrus, Proestrus, Estrus und Metestrus. Mittels morphologischer Untersuchungen lassen sich die Stadien an Hand ihrer besonderen Charakteristika bezüglich der Anzahl und des Phänotyps der einzelnen Zellen in der Vaginalflüssigkeit bestimmen. Der Diestrus ist gekennzeichnet durch eine zähe Konsistenz der Vaginalflüssigkeit, welche sehr viele Leukozyten und wenige kernhaltige Epithelzellen enthält (Abb. 4A). In diesem Stadium beginnen das Wachstum und die Reifung der Follikel im Eierstock. Der folgende Proestrus ist charakterisiert durch viele kleine, runde kernhaltige Epithelzellen, welche einzeln oder in Zellhaufen vorliegen können. Man findet keine oder nur wenige Leukozyten (Abb. 4B). Im Proestrus steigt der Östrogenspiegel sprunghaft an und mehrere Eizellen erreichen ihre maximale Reife in den Follikeln. Im empfänglichen Stadium, dem Estrus, sind die Epithelzellen bereits größtenteils abgestorben und liegen als schuppenartige Zellen mit degeneriertem Zellkern vor (Abb. 4C). Zum Ende des Estrus wird die Vaginalflüssigkeit zu einer käsigen Masse aus adhärenen Epithelzellen. Unter dem Einfluss von Progesteron, LH und FSH findet jetzt der Eisprung statt. Im letzten Stadium des Estruszyklus, dem Metestrus, liegen nur noch wenige schuppenartige Epithelzellen und vermehrt Leukozyten vor (Abb. 4D)^{[8][9]}. Im Falle einer Befruchtung wandern die befruchteten

Eizellen den Eileiter entlang zum Uterus. Der Gelbkörper wächst innerhalb der nächsten 24 Stunden zu seiner vollen Größe heran. Falls keine Befruchtung stattgefunden hat, werden die unbefruchteten Eizellen eliminiert. Entsprechend dem Menstrualzyklus beim Menschen lassen sich der Proestrus und der Estrus zur Follikelphase und der Metestrus und Diestrus zur Lutealphase zusammenfassen.

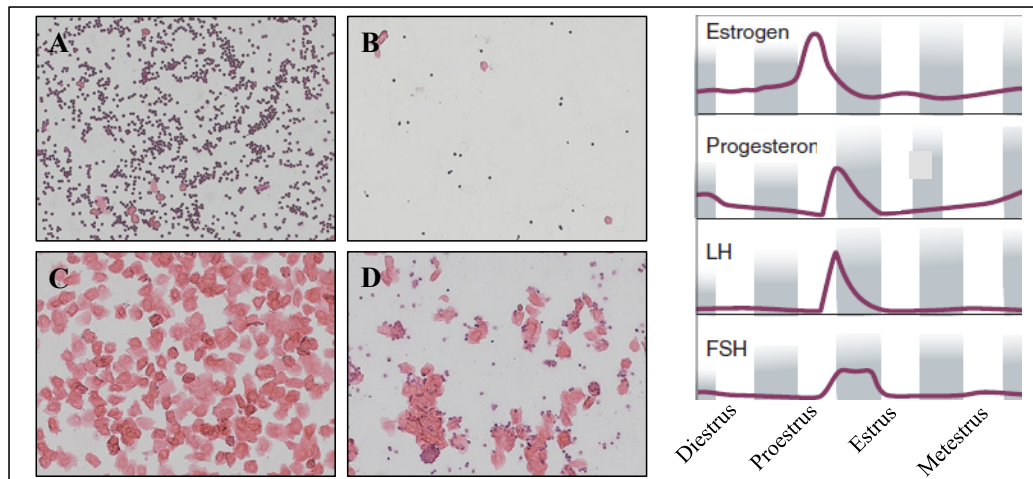


Abb. 4: Darstellung des Estruszyklus bei der Maus. Die einzelnen Stadien des Estruszyklus lassen sich an Hand ihrer Charakteristika bezüglich der Anzahl und des Phänotyps der Zellen in der Vaginalflüssigkeit bestimmen. HE-Färbung, Vergrößerung: X200. **A** – Diestrus, **B** – Proestrus, **C** – Estrus, **D** – Metestrus. Abbildung **E** entnommen aus Literaturangabe^[10].

2.2.2 Die frühe Schwangerschaft bei der Maus

Die Schwangerschaft der Maus dauert 20-21 Tage und lässt sich in drei Phasen unterteilen: a) vor der Einnistung der Blastozyste in die Gebärmutterwand (Uteruswand), b) in den Zeitpunkt der Einnistung und c) in die Phase nach der Einnistung, welche die Gastrulation, Organogenese und das Wachstum des Feten bis zur Geburt umfasst.

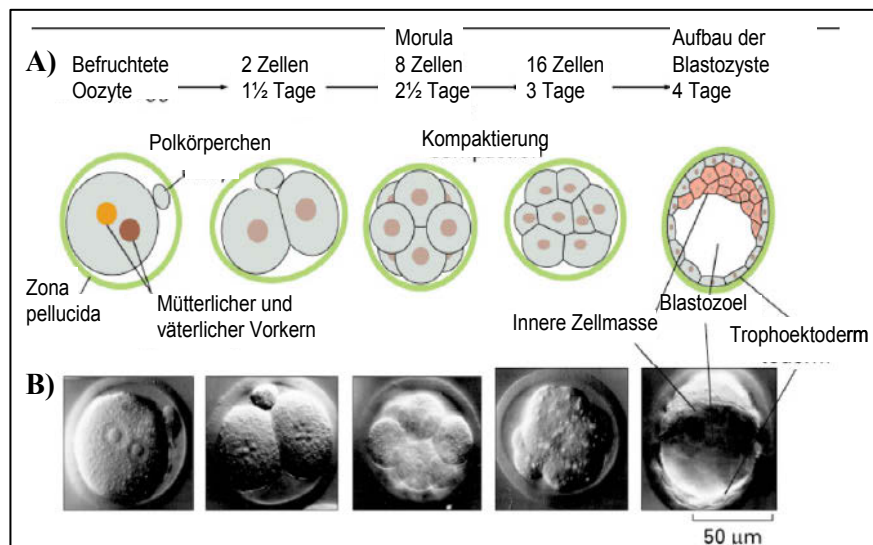


Abb. 5: Darstellung der frühen Schwangerschaft bei der Maus von der Befruchtung bis zur Implantation.

Nach Befruchtung der Oozyte unterläuft die Zygote mehreren Zellteilungen bis zum Stadium der Blastozyste, die sich in die Uteruswand einnistet. In Teil A ist die präimplantatorische Phase schematisch dargestellt, wohingegen Teil B die entsprechenden elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigt. Abbildung entnommen und modifiziert aus Literaturangabe^[11].

Jede Oozyte wird im Eileiter durch ein einzelnes Spermium befruchtet (Tag 0 der Schwangerschaft). Es wird von einer äußeren Schutzschicht eingehüllt, der *Zona pellucida* (Vitellinhülle) (Abb. 5). Kurz nach der Befruchtung wandert der männliche und weibliche Vorkern (Pronukleus) in das Zentrum der Oozyte. Innerhalb der nächsten 18-21 Stunden brechen die Membranen der Pronuklei durch und die einzellige Zygote beginnt sich mehrmals zu teilen (Abb. 5). Diesen Vorgang bezeichnet man als Furchung. Die erste Furchung setzt 24 Stunden nach der Befruchtung ein, alle weiteren folgen in Intervallen von 12 Stunden. Auf diese Weise entsteht eine kompakte Zellkugel, die Morula (Maulbeerkeimling). Im Acht-Zellstadium vergrößern die Blastomeren ihre Kontaktflächen, über die sie sich berühren. Dieser Vorgang wird als Verdichtung (Kompaktierung) bezeichnet (Abb. 5). Alle weiteren Furchungen verlaufen unterschiedlich, radial und tangential. Eine Morula, die einem 32-Zellstadium entspricht, enthält daher etwa zehn innere und mehr als 20 äußere Zellen. Die inneren Zellen der Morula bilden die innere Zellmasse und die äußeren Zellen das Trophoektoderm. Letzteres bildet extraembryonale Strukturen wie die Plazenta. Der eigentliche Embryo entwickelt sich aus der inneren Zellmasse. In diesem Stadium (3,5 Tage nach Beginn der Schwangerschaft) bezeichnet man den Embryo als Blastozyste (Abb. 5). Das Trophoektoderm pumpt Flüssigkeit in das Innere der Blastozyste. Dadurch weitet sie sich zu einem flüssigkeitsgefüllten Vesikel, der an einer Seite die innere Zellmasse

enthält. Dreieinhalb bis viereinhalb Tage nach Beginn der Schwangerschaft teilt sich die innere Zellmasse. Aus der Schicht an der Oberfläche, die mit der flüssigkeitgefüllten Höhle der Blastozyste (Blastozoel) in Kontakt steht, wird das primitive Entoderm. Die übrige innere Zellmasse, das primitive Ektoderm (Epiblast), entwickelt sich dagegen zum eigentlichen Embryo. In diesem Stadium löst sich der Embryo aus der *Zona pellucida* und nistet sich in der Gebärmutterwand ein. Nach der Implantation der Blastozyste beginnt der letzte Abschnitt der Embryonalentwicklung der Maus, welcher die Gastrulation, Organogenese und das Wachstum des Feten bis zur Geburt einschließt. Im Rahmen dieser Arbeit wird dieser Zeitraum nicht näher erläutert^[12].

2.2.3 Entwicklung und Morphologie der Mausplazenta

Die Entstehung der Plazenta der Maus beginnt mit der Implantation der Blastozyste (Abb. 6) in die Uteruswand. Zu diesem Zeitpunkt (4,5 Tage nach Beginn der Schwangerschaft) differenziert sich das Trophoektoderm zu den verschiedenen Trophoblastzelltypen. Die Trophoektodermzellen, welche auf der inneren Zellmasse aufliegen, beginnen zu proliferieren und werden zum diploiden extraembryonalen Ektoderm und ektoplazentalen Kegel. Die äußeren Trophoektodermzellen replizieren ihre DNA ohne sich zu teilen (Endoreduplikation) und werden zu Riesenzellen. Die Riesenzellen dringen durch die oberste Epithelschicht des Endometriums und durch die Basallamina in das darunter liegende Stroma vor (Abb. 6) Bei diesem Vorgang lösen sich die Epithelzellen von der Basalmembran, degenerieren und werden durch die Trophoblastzellen phagozytiert. Zeitgleich setzt die sogenannte Dezidualisierung ein, bei der sich die Stromazellen zu Deziduazellen differenzieren^[13].

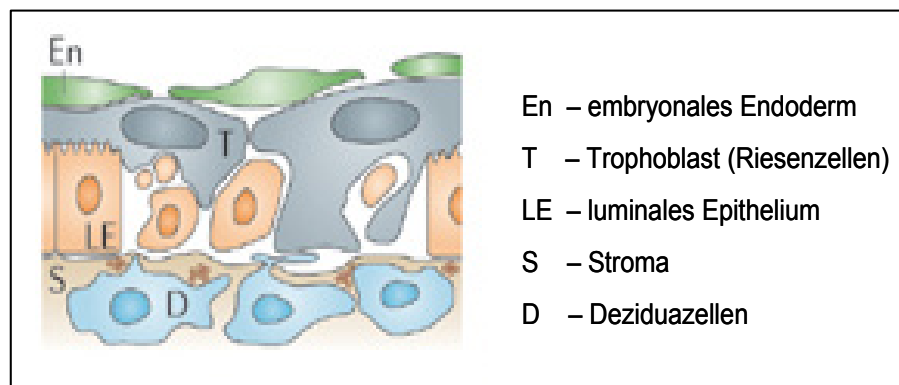


Abb. 6: Invasion des Trophoblasten in das mütterliche Endometrium. Riesenzellen dringen durch die oberste Epithelschicht des Endometriums und durch die Basallamina in das darunter liegende Stroma vor. Gleichzeitig wandeln sich die Stromazellen des Endometriums in Deziduazellen um. Abbildung entnommen und modifiziert aus Literaturangabe^[13].

Die Implantation der Blastozyste ist auf den bestimmten Zeitraum beschränkt, in welchem sich das Endometrium in der rezeptiven (empfindlichen) Phase befindet. Eine Einnistung wird daher nur zwischen dem vierten und sechsten Tag nach Beginn der Schwangerschaft begünstigt. Verschiedene Faktoren erhöhen die Bereitschaft des Endometriums für eine intime Wechselwirkung mit der Blastozyste. So werden vermehrt Adhäsionsmoleküle, Zytokine, Hormone und andere Proteine exprimiert, welche den Implantationsvorgang erleichtern. Eine besondere Rolle kommt dabei den beiden Steroidhormonen Progesteron und Östrogen zu. Ein hoher Progesteronspiegel und der Einfluss von Östrogen sind notwendig, um am Ende des vierten Schwangerschaftstages von der nicht-rezeptiven Phase in die rezeptive Phase überzugehen. Am sechsten Schwangerschaftstag befindet sich das Endometrium in einer refraktären Phase, in der eine Einnistung der Blastozyste nicht mehr begünstigt wird^[13].

Nach der Implantation werden weitere Riesenzellen von den äußeren Regionen des ekto-plazentalen Kegels gebildet und umgeben den gesamten Embryo (Abb. 7 S6.0). Das extraembryonale Ektoderm dehnt sich aus und bildet das Ektoderm des Chorions, welches von einer dünnen Mesothelzellschicht umgeben ist. Die Allantois entsteht aus dem Mesoderm am hinteren Ende des Embryos und steht ab Tag 8,5 der Schwangerschaft mit dem Chorion in direktem Kontakt (Abb. 7 S7.5). Dieses Ereignis wird als chorion-allantoische Fusion bezeichnet. Mehrere Stunden nach der Fusion faltet sich das Chorion auf und markiert die Stelle, wo die feto-maternalen Blutgefäße aus der Allantois einwachsen und die fetalen Komponenten des plazentalen Gefäßnetzwerkes bilden. Das Chorion verzweigt sich stark

und bildet so eine dicht gepackte Struktur, das Labyrinth. Gleichzeitig differenzieren sich die Chorionzellen zu den verschiedenen Schichten des Labyrinthes (Abb. 7 S12.5)^[14].

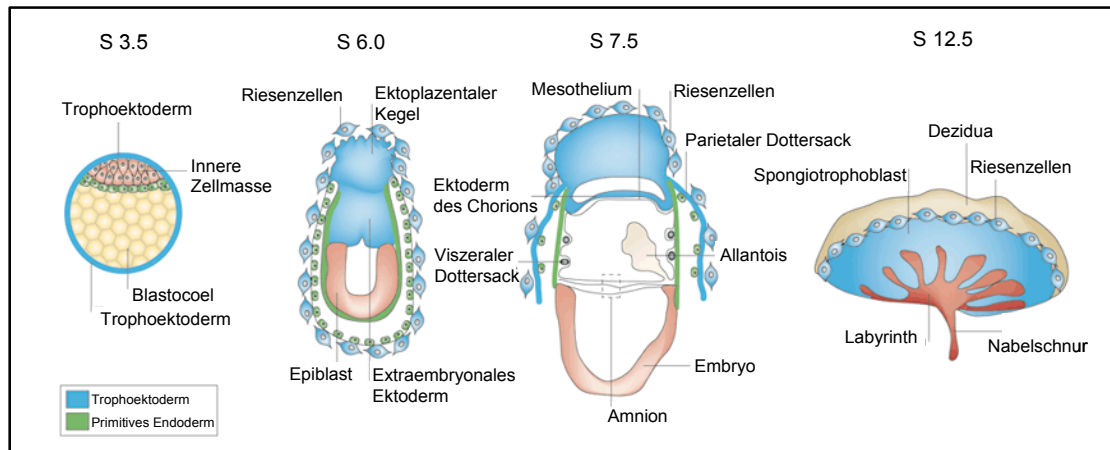


Abb. 7: Entstehung der Mausplazenta nach Implantation der Blastozyste zwischen den Schwangerschaftstagen 3.5 -12.5. Dargestellt sind die Ursprünge des extraembryonalen Gewebes und der Bestandteile der Plazenta. Abbildung entnommen und modifiziert aus Literaturangabe^[14].

Bei Mäusen setzt sich das Labyrinth aus zwei Schichten von Synzytiotrophoblastzellen zusammen, die sich direkt neben den Endothelzellen der fetalen Blutgefäße befinden. Gestützt wird das Labyrinth durch die Spongiotrophoblastzellen, welche eine kompakte Schicht von nicht-synzytialen Zellen zwischen dem Labyrinth und den Riesenzellen bilden. Man geht davon aus, dass sich der Spongiotrophoblast weitgehend vom ektoplazentalen Kegel ableitet. Die mütterliche Blutversorgung erfolgt über große zentrale arterielle Sini, die durch den Spongiotrophoblast verlaufen. In diesen Blutgefäßen sind die Endothelzellen größtenteils durch Trophoblastzellen ersetzt. Das mütterliche Blut fließt in die gewundenen kleinen Räume des Labyrinths ein und tritt hier in direkten Kontakt mit den fetalen Trophoblastzotten, wo der Austausch von Nährstoffen und Atemgasen zwischen beiden Kreisläufen erfolgt^[14]. Am Tag 14 nach Beginn der Schwangerschaft ist die Plazenta voll ausgebildet und zeigt im Vergleich zum Fetus kein Wachstum mehr^[15].

2.3 Plazentatypen

Der anatomische Aufbau der Plazenta ist bei den verschiedenen Spezies unterschiedlich. Neben der äußeren Form spielt für die Unterscheidung zwischen den einzelnen Spezies vor allem der Bau der Diffusionsmembran zwischen dem mütterlichen und fetalen Kreislauf eine entscheidende Rolle. Die

mütterlichen Schichten, welche die Diffusionsbarriere bilden, können bei den einzelnen Spezies unterschiedlich stark abgebaut sein. Daher werden nach Grosser (1919) folgende Plazentatypen unterschieden:

Plazentatypen / Vorkommen	Wandschichten (Mutter → Fetus)
<i>Placenta epitheliochorialis</i> (Pferd, Schwein)	Endothel-Bindegewebe-Uterusepithel-Chorionepithel-Bindegewebe-Endothel
<i>Placenta syndesmochorialis</i> (Schaf)	Endothel-Bindegewebe-Chorionepithel-Bindegewebe-Endothel
<i>Placenta endotheliochorialis</i> (Raubtiere)	Endothel-Chorionepithel-Bindegewebe-Endothel
<i>Placenta haemochorialis</i> (Mensch, Maus, Ratte)	Chorionepithel-Bindegewebe-Endothel

Beim letztgenannten Plazentatyp, der *Placenta haemochorialis*, steht das mütterliche Blut in direktem Kontakt zum fetalen Gewebe. Diese starke Reduktion der Diffusionsstrecke ermöglicht eine erhebliche Verbesserung der Diffusionsgeschwindigkeit^{[7][16]}. Dieser Plazentatyp kommt sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen vor. Im Vergleich zu Mäusen, welche eine Labyrinthplazenta besitzen, verfügt der Mensch jedoch über eine Zotten- oder Topfplazenta. Hier weitet sich das mütterliche Blutgefäßsystem zu einem großen einheitlichen Blutraum aus, dem intervillösen Raum. In diesen ragen mit verzweigten, freien Enden die Chorionzotten und werden vom Blut umspült.

2.4 Komplikationen in der Schwangerschaft

Zu den häufigsten Komplikationen in der Schwangerschaft zählen neben dem Abort auch extrauterine Schwangerschaften, die fetale Wachstumsretardierung und die Präeklampsie.

2.4.1 Definition und Epidemiologie des Abortes

Der Abort (Fehlgeburt) wird als nichtartifizierter Verlust der Schwangerschaft vor Eintritt der Lebensfähigkeit des Kindes verstanden. Früher wurden Feten ab einem Geburtsgewicht von > 500 g als lebensfähig angesehen. Heutzutage wird die Überlebenswahrscheinlichkeit des Kindes auf Grund der Fortschritte in der neonatologischen Intensivmedizin nach dem Schwangerschaftszeitpunkt bemessen. Hierbei werden bis zur 22. SSW keine lebensrettenden Maßnahmen durchgeführt. Zwischen der 22. und 23. SSW entscheiden die Eltern zusammen mit den Ärzten über die Sinnhaftigkeit der Durchführung von lebensrettenden Maßnahmen. Ab der 24. SSW sind die Ärzte verpflichtet, das Kind unter bestmöglicher medizinischer Versorgung am Leben zu erhalten. Die Rate an klinischen Aborten nach Ausbleiben der Regelblutung, bezogen auf die Gesamtzahl aller festgestellten Schwangerschaften, liegt im Mittel zwischen 11 und 15 %^{[17][18]}. Bis zu viermal mehr Embryonen dürften in der kurzen

Zeitspanne zwischen Implantation und Regelblutung unbemerkt abgehen und weitere rund 15 % noch vor der Implantation, wodurch die Rate an präklinischen und klinischen Aborten zusammen deutlich über 50 % betragen dürfte^[17]. Von Bedeutung für die Klinik ist die Unterscheidung zwischen sporadischen Aborten und dem habituellen Abortgeschehen, das bei drei aufeinanderfolgenden Fehlgeburten vorliegt. Des Weiteren unterscheidet man in a) den vollständigen Abort (*abortus completus*), i. d. R. Frühabort (bis 16. SSW) unter Ausstoßung des Eies (Embryo, Amnionsack und Chorionhülle) und b) den unvollständigen Abort (*abortus incompletus*), i. d. R. Spätabort (16.-28. SSW) unter geburtsähnlicher Ausstoßung des Feten und der Plazenta, von der häufig Teile im Uterus verbleiben.

2.4.2 Abortursachen

Zu den Ursachen eines spontanen Abortes gehören genetische Anomalien (Chromosomenstörungen) der Elternteile oder der Fruchtanlage, lokale oder generalisierte Infektionen (z.B. mit *Chlamydia trachomatis*, *Toxoplasma gondii*, Zytomegalie-Viren) sowie mütterliche Störungen oder Erkrankungen (z.B. *corpus luteum*-Insuffizienz, uterine Fehlbildung, Diabetes mellitus, Gerinnungsstörungen) und psychosoziale Faktoren (z.B. Krieg, Flucht, Trennung)^[18]. Neben diesen Abortursachen gibt es eine bedeutende Anzahl von Aborten, für die man immunologische Gründe verantwortlich macht. Das trifft insbesondere bei Aborten zu, deren Ursachen ungeklärt sind. Der Hauptgewebekompatibilitätskomplex (MHC, *major histocompatibility complex*) dient der immunologischen Unterscheidung zwischen Selbst und Fremd. Beim Menschen wird der MHC als Humanes Leukozyten Antigen- (HLA-) System bezeichnet. Man unterscheidet die HLA-A, -B und -C Antigene, die der Klasse 1 zugeordnet und auf fast allen Körperzellen exprimiert werden sowie die zu den Klasse 2-Antigenen gehörenden HLA-DR, -DQ und -DP, die auf B-Lymphozyten, Monozyten und aktivierten T-Lymphozyten exprimiert werden. Da die einzelnen HLA-Genorte stark polymorph sind, besteht nur eine geringe Wahrscheinlichkeit, dass nicht miteinander verwandte Personen HLA-identisch oder in den HLA-Antigenen ähnlich sind. Dieser genetische Polymorphismus scheint eine Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Schwangerschaft zu sein. So stellten Taylor und Mitarbeiter sowie Beer und Mitarbeiter fest, dass eine zu große Übereinstimmung der HLA-Antigene zu Abort prädisponiert^{[20][21]}. Andere Autoren wie Mc Intyre und Mitarbeiter sowie Heine und Mitarbeiter vertraten die These, dass diese zu große Gleichheit zwischen Mann und Frau die Ursache einer nicht ausreichenden immunologischen Antwort der Mutter auf die Zellen ihres Partners ist^{[22][23]}. Im Rahmen der immunologischen Diagnostik hat sich bei Patientinnen mit Abortneigung gezeigt, dass sie eine verminderte immunologische Reaktivität in der gemischten Leukozytenreaktion (MLR) und einen negativem Cross-Match aufweisen^[24]. Andere Studien wieder-

rum belegen, dass die erhöhte Abortneigung unabhängig von der Zahl der HLA-Übereinstimmungen ist^[25]. Es bleibt daher ungeklärt, ob eine zu hohe Übereinstimmung in den HLA-Genloci mit einer erhöhten Abortrate assoziiert ist.

2.4.3 Das immunologische Mausabortmodell

Da menschliche Gewebeproben zur Untersuchung der immunologischen Ursachen eines Spontanabortes nur eingeschränkt zur Verfügung stehen und mit Patientenproben nur begrenzt funktionelle Untersuchungen durchgeführt werden können, hat man sich in den letzten Jahren das von Clark und Kollegen (1980) beschriebene immunologische Mausabortmodell zu Nutze gemacht, um grundlegende Mechanismen des Spontanabortes aufzuklären^[26]. Das Modell besteht aus zwei Verpaarungskombinationen mit unterschiedlichem Schwangerschaftsausgang. Bei der Verpaarung von CBA/J-Weibchen (H2^k) mit BALB/c-Männchen (H2^d) kommt es zu einer normal verlaufenden Schwangerschaft mit gesunden Implantationen und einem Median der Abortrate von 0 %. Im Vergleich dazu treten bei der Verpaarung der CBA/J-Weibchen (H2^k) mit DBA/2J-Männchen (H2^d) vermehrt Aborte (Resorptionen) auf und der Median der Abortrate liegt in Abhängigkeit vom Tierstall zwischen 20-50 %. Da die Weibchen die gleichen sind und die Männchen über die gleichen Hauptgewebeverträglichkeitsantigene verfügen, führt man die erhöhte Abortrate auf die unterschiedlichen männlichen Nebengewebeverträglichkeitsantigene zurück^[26]. Des Weiteren konnten Chaouat und Mitarbeiter bei der CBA/J x DBA/2J-Verpaarung im Vergleich zur CBA/J x BALB/c-Verpaarung eine verminderte Produktion von schwangerschaftsprotektiven Typ-2-Zytokinen wie IL-4 und IL-10 feststellen^{[27][28]}. Ebenso war es ihnen möglich eine schwangerschaftsschädigende Wirkung der Typ-1-Zytokine IL-2, TNF- α und IFN- γ sowohl für die Abortkombination CBA/J x DBA/2J als auch für die Kontrollverpaarung CBA/J x BALB/c nachzuweisen. Mittels IL-10- oder anti-IFN- γ -Injektionen konnte die Abortrate gesenkt bzw. durch eine anti-IL-10-Injektion noch gesteigert werden. Weitere Untersuchungen am CBA/J x DBA/2J-Modell ergaben eine Überproduktion des Typ-1-Zytokins IL-6 an der fetal-mütterlichen Grenzfläche^[29] sowie eine verminderte HO-1-Expression im Vergleich zur Normalschwangerschaftsverpaarung CBA/J x BALB/c^[30]. Insgesamt betrachtet stellt das Mausabortmodell ein zuverlässiges Mittel dar, Mechanismen, die dem immunologischen Abort zu Grunde liegen, zu untersuchen^[31].

2.5 Immunologie der Schwangerschaft beim Menschen und bei der Maus

2.5.1 Paradoxon der Schwangerschaft

Nach den Mendel'schen Vererbungsregeln erbt der Fetus jeweils die Hälfte aller Gene der Mutter und des Vaters. Er ist daher bezüglich der Mutter *semiallogen*. Vom immunologischen Standpunkt aus ist der Fetus daher ein Fremdkörper, ein semiallogenes Transplantat. Da semiallogene Transplantate, z.B. solche von den eigenen Kindern, abgestoßen werden, ist die Erhaltung der Schwangerschaft in der immunkompetenten Mutter aus klassisch-immunologischer Sicht ein Paradoxon. In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene Modelle vorgeschlagen, um dieses Paradoxon zu erklären. Im Jahre 1953 stellte Sir Peter Medawar seine Hypothesen zur Erklärung der immunologischen Toleranz der Mutter gegenüber dem Fetus auf. Er postulierte drei Gründe, weshalb die Mutter den Fetus nicht abstößt: (a) die physikalische Trennung zwischen Mutter und Fetus, (b) die immunologische Unreife des Feten und (c) die verminderte Immunantwort der Mutter gegenüber dem Fetus^[32]. Heutzutage weiß man, dass keine der von Medawar vorgeschlagenen Gründe die fetal-mütterliche Toleranz erklären kann. Erstens konnte gezeigt werden, dass fetale und mütterliche Zellen in engem Kontakt zueinander stehen und somit der Trophoblast und vom Fetus abgeleitete Zellen gegenüber mütterlichen Immunzellen exponiert sind, die das Potential haben, das fremde Gewebe abzustoßen. Darüber hinaus konnte ein bidirektionaler Zelltransfer zwischen Mutter und Fetus sowohl in der menschlichen Schwangerschaft als auch in der Mausschwangerschaft nachgewiesen werden, sodass ein Kontakt zwischen beiden Individuen auch außerhalb des Uterus möglich ist^{[33][34][35]}. Zweitens kann das Immunsystem des Feten nicht als immunologisch unreif angesehen werden, da fetale Dendritische Zellen (DZ) Hauptgewebeverträglichkeitskomplexe der Klasse II (MHC II) exprimieren und polyklonale T-Zellantworten stimulieren können. Überdies konnte gezeigt werden, dass fetale Effektor T-Zellen aktiviert werden können^[36]. Drittens gibt es klare Hinweise darauf, dass mütterliche T-Zellen fetale Antigene erkennen können und dass diese zum Aufbau einer antigenspezifischen Toleranz beitragen^{[37][38][39]}. Die fetal-mütterliche Grenzzone kann daher ähnlich wie der Hoden, das Auge und das Gehirn als ein immunprivilegiertes Ort angesehen werden, an welchem der Fetus selbst zu seiner Akzeptanz beiträgt^[40].

2.5.2 Überlebensstrategien des Feten im Uterus der Mutter

An der fetal-mütterlichen Grenzfläche kommt es zu einem ständigen Kontakt zwischen dem *semiallogenen* fetalen Gewebe (Trophoblasten) und dem mütterlichen Blutsystem. Die Expression von väter-

lichen Antigenen auf der Oberfläche der Trophoblastzellen führt zu einer Aktivierung von mütterlichen humoralen und zellulären Immunantworten. Um sein Überleben in dieser feindlichen Umgebung zu sichern, hat der Fetus verschiedene Mechanismen zu seinem Schutz entwickelt. Klassische HLA-Antigene der Klasse I und II, welche zu einer Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Zellen führen, werden nur in geringer Anzahl oder gar nicht von den Trophoblastzellen exprimiert^[41]. Dagegen wird die Expression von nichtklassischen HLA-Antigenen wie HLA-G hochreguliert. Es wurde beschrieben, dass eine Interaktion zwischen dem HLA-G-Antigen mit mütterlichen Natürlichen Killer (NK)-Zellen zu deren Inaktivierung führt^[42]. Des Weiteren konnte in Trophoblastzellen die Expression des Fas-Rezeptors nachgewiesen werden. Dieser aktiviert nach Bindung an seinem Liganden (FasL) auf aktivierten mütterlichen Lymphozyten den Apoptoseweg in diesen Zellen^[43]. Allerdings konnte eine Studie von Rogers und Kollegen zeigen, dass trotz funktioneller Defekte im Fas-FasL-System der Schwangerschaftserfolg nicht beeinträchtigt war^[44]. Munn und Mitarbeiter sowie Mellor und Mitarbeiter konnten zudem zeigen, dass das fetale Gewebe durch die Aktivität des Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) die Ausschüttung von Tryptophan vermindert, einer für Zellen mit einer hohen Proliferationsrate (wie T-Zellen) essentiellen Aminosäure^{[45][46]}. Die zu starke Vermehrung reaktiver mütterlicher Immunzellen wird auf diesem Weg verhindert. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Schwangerschaften, bei denen beiden Partnern das Enzym IDO fehlte, normal verliefen. Daher kann dem Molekül zwar eine Rolle beim Aufbau der Toleranz zugeschrieben werden, aber gleichzeitig kann seine Abwesenheit durch andere Mechanismen kompensiert werden^[47]. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass der Trophoblast darüber hinaus Faktoren sezerniert, welche Monozyten anlocken und eine Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen in diesen Zellen induzieren. Die ausgeschütteten Proteine sind für die Implantation der Blastozyste und für das fetale Wachstum notwendig^[48]. Neben den vom Fetus zu seinem Selbstschutz entwickelten Strategien unterstützt auch das mütterliche Immunsystem aktiv die Toleranz des Feten. Hierbei spielen sowohl Zellen des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems eine entscheidende Rolle.

2.5.3 Zelluläre Mechanismen der Mutter zum Schutz des Feten

2.5.3.1 Zellen des angeborenen Immunsystems

Die ersten mütterlichen Zellen, die bei der Insemination mit den fremden väterlichen Antigenen des Samens in Kontakt treten, sind Antigen-präsentierende Zellen (APZ) aus der Vaginalflüssigkeit. Als „professionelle“ APZ gelten Makrophagen und DZ. DZ lassen sich grundsätzlich in zwei Subtypen, myeloide DZ und plasmazytoide DZ, unterteilen. An Hand des Oberflächenmarkers CD11c lassen sich

myeloide DZ charakterisieren und aus Gesamtzellsuspensionen isolieren. Unsere Arbeitsgruppe konnte sowohl mütterliche CD11c⁺-Zellen als auch väterliche Antigene in der Vaginalflüssigkeit direkt nach der Insemination nachweisen^[49]. Gleichzeitig konnte ein Anstieg an Regulatorischen T-Zellen (T_{reg}-Zellen), die spezifisch väterliche Antigene schützen, beobachtet werden. Arbeiten unserer und anderer Arbeitsgruppen konnten bestätigen, dass unreife DZ die Expansion von T_{reg}-Zellen begünstigen^[50] (unveröffentlichte Daten von Dr. Paul Wafula). Immunregulierende Moleküle wie Galektin-1 und Hämoxxygenase-1 (HO-1) modulieren den Reifezustand von DZ und tragen somit zur DZ-vermittelten Expansion von T_{reg}-Zellen und zum Schutz des Feten bei^{[51][52][53][54][55]} (unveröffentlichte Daten von Dr. Paul Wafula). Neben den DZ spielen uterine NK (uNK)-Zellen eine entscheidende Rolle für den Schwangerschaftserfolg. Diese spezielle Subpopulation der NK-Zellen repräsentiert bis zu 75 % der Lymphozyten im Uterus^[56]. Es konnte gezeigt werden, dass uNK-Zellen die Trophoblasteninvasion und die Ausbildung der Spiralarterien begünstigen^[57]. Als wichtiger Überlebensfaktor für uNK-Zellen ist Interleukin 15 (IL-15) beschrieben worden. IL-15-defiziente Mäuse besitzen keine uNK-Zellen und weisen eine abnormale Ausbildung der Spiralarterien auf^[58]. Dennoch sind diese transgenen Mäuse in der Lage gesunden Nachwuchs zu gebären. Erste Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe lassen vermuten, dass sich das Enzym HO-1 auf die Anzahl der uNK-Zellen an der fetal-mütterlichen Grenzfläche auswirkt, indem es die Migration der uNK-Zellen zur fetal-mütterlichen Grenzfläche oder deren Überleben direkt vor Ort beeinflusst (unveröffentlichte Daten von Nadja Linzke). Neueste Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass auch Mastzellen (MZ) entscheidend zum Schwangerschaftserfolg beitragen (unveröffentlichte Daten von Katja Woidacki). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Anzahl an MZ und deren Histamingehalt während der Schwangerschaft stetig ansteigt^{[59][60]}. Die Freisetzung von Substanzen aus den Granula der MZ scheint einen entscheidenden Einfluss auf die Angiogenese und den Gewebeumbau vor und während der Implantation zu haben^[61]. Unterstützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass MZ-defiziente Mäuse verminderte Implantationsraten aufweisen (unveröffentlichte Daten von Katja Woidacki). Im Jahr 2006 konnten Lu und Kollegen zeigen, dass MZ darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der schützenden Funktion von T_{reg}-Zellen für die Akzeptanz von Allogtransplantaten spielen^[62]. Unsere Arbeitsgruppe konnte bestätigen, dass der adoptive Transfer von T_{reg}-Zellen in das Mausabortmodell zu einem Anstieg an MZ und deren assoziierten Genen führte (unveröffentlichte Daten von Dr. Milan Popovic). Weitere Versuche konnten zeigen, dass physiologische Mengen von Östradiol und Progesteron die Expression von Chemokinrezeptoren auf MZ hochregulieren und die MZ-Degranulation fördern (Dr. Federico Jensen, in Begutachtung). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Schwangerschaftshormone die Migration der MZ zum Uterus entlang eines vom Trophoblasten hervorgerufenen Chemokingradienten fördern und

an der fetal-mütterlichen Grenzfläche den Uterus für eine mögliche Implantation durch Degranulation der MZ vorbereiten.

2.5.3.2 Zellen des adaptiven Immunsystems

Wenig ist über die Beteiligung von B-Zellen und ihren Antikörpern (AK) am Schwangerschaftserfolg bekannt. Verschiedene Studien sehen die Entstehung von allo-AK als Voraussetzung für eine erfolgreiche Schwangerschaft, um die zytotoxische Wirkung von NK-Zellen gegenüber dem Trophoblasten zu inhibieren^{[63][64]}. Es konnte gezeigt werden, dass asymmetrische AK (AAK) während der Schwangerschaft im Serum und in der Plazenta erhöht sind. Diese durch ihre molekulare Asymmetrie gekennzeichneten AK können spezifisch väterliche Antigene blockieren, sodass diese von Immunzellen nicht erkannt werden können. Darüber hinaus sind sie in weitere komplexe Immunmechanismen involviert, die den Fetus schützen^{[63][65][66][67][68]}. Lösliche Faktoren (wie Zytokine), die von der Plazenta sezerniert werden, konnten die Synthese von AAK *in vivo* und *in vitro* erhöhen^{[68][69]}. Es kann daher vermutet werden, dass der Fetus selbst zur Bildung dieser für seinen Schutz wichtigen AK beiträgt. Neben den von B-Zellen sezernierten AK, hat sich die Forschung in den letzten Jahrzehnten besonders auf die Zytokinproduktion von T-Zellen konzentriert. Das Th1/Th2/Th3-Paradigma beschreibt, dass die Balance zwischen Typ1- (Th1-) Zytokinen und Typ2/3- (Th2/Th3-) Zytokinen für den Verlauf der Schwangerschaft entscheidend ist. Th2- und Th3-Zytokine wie IL-4, IL-10 und Transforming Growth Factor- β (TGF- β) wurden als schwangerschaftsfördernd^{[70][71][72][73][74]} und Th1-Zytokine wie IL-2, Interferon- γ (IFN- γ) und Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) als schwangerschaftsbeeinträchtigend^{[75][76][77]} beschrieben. Allerdings konnten verschiedene Studien zeigen, dass Mäuse, die defizient für Th2-Zytokine sind, normal schwanger werden können^{[78][79]}. Dies lässt darauf schließen, dass das Zytokinprofil eher als Konsequenz und nicht als Ursache für den Abort zu sehen ist. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die Menge an Th1- oder Th2-Zytokinen in der normalen Schwangerschaft in Abhängigkeit vom Schwangerschaftsstadium und vom Gewebe variiert. Demnach scheint der Schwangerschaftserfolg eher von der Dominanz der Th1- oder Th2-Zytokine zu bestimmten Schwangerschaftszeitpunkten abzuhängen, als von der alleinigen Dominanz eines Zytokintyps über die gesamte Schwangerschaft hinweg. Kürzlich wurde eine neue Linie von T-Helferzellen beschrieben, die auf Grund ihrer hohen Expression an IL-17 als Th17-Zelllinie bezeichnet wird^{[80][81]}. IL-17 ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches eine entscheidende Rolle bei der Abwehr von extrazellulären Bakterien spielt^{[80][81]}. Zusammen mit anderen inflammatorischen Zytokinen wie IFN- γ und TNF- α kann IL-17 lokale Entzündungen fördern und eine fetale Abstoßung bedingen^[82]. Hierfür sprechen

neueste Daten, die gezeigt haben, dass die Anzahl an Th17-Zellen im Blut und in der Dezidua von Frauen mit habituellen Aborten gegenüber normal schwangeren Frauen signifikant erhöht war^{[83][84]}. Im Gegensatz dazu konnte demonstriert werden, dass das von Th17-Zellen produzierte IL-10 die Proliferation und Zytokinproduktion von Th1-Zellen hemmen kann und somit den Fetus schützen^[85]. Daher sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Rolle der Th17-Zellen in der Schwangerschaft zu klären.

2.5.4 Immunregulierende Moleküle während der Schwangerschaft

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit bestimmter Moleküle für die Vorbereitung des Uterus auf die Implantation sowie für die Implantation an sich unerlässlich ist. So konnte nachgewiesen werden, dass die Expression des Leukämie-inhibitorischen Faktors (LIF) am Tag 4 der Mausschwangerschaft stark ansteigt. Die erhöhte Expression von LIF konnte mit der Regulation des Wachstums und der Implantation der Blastozyste in Zusammenhang gebracht werden^[86]. Es konnte gezeigt werden, dass normal entwickelte Blastozysten sich nicht in den Uterus von LIF-defizienten Mäuseweibchen einnisten, wohingegen die Einnistung von LIF-defizienten Embryonen in den Uterus eines Wildtypweibchens erfolgreich war^[87]. Beim Menschen gewonnene Daten konnten die unentbehrliche Funktion von LIF für die Schwangerschaft bestätigen. Hier konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Produktion von LIF im Uterus die Fertilität der Frauen entscheidend beeinträchtigt^[88]. Das immunsuppressive Zytokin TGF- β konnte in großen Mengen in der Samenblasenflüssigkeit des Menschen und der Maus nachgewiesen werden. Unmittelbar nach der Insemination wird das zunächst noch in latenter Form vorliegende TGF- β im Vaginaltrakt des Weibchens aktiviert. Es konnte demonstriert werden, dass TGF- β eine Immunantwort induziert, die für die Implantation essentiell ist^[89]. Neben LIF und TGF- β spielt das anti-inflammatorische und anti-apoptotische Enzym HO-1 eine unverzichtbare Rolle für den Implantationsprozess und für die Bildung der Plazenta. Kürzlich haben Zhao und Kollegen gezeigt, dass HO-1-heterozygote Verpaarungen eine extrem niedrige Geburtenrate von HO-1-homozygoten Nachkommen (2,4 % versus erwartete 25 % nach der Mendel'schen Regel) aufweisen. Plazenten und Feten der heterozygoten Verpaarungen waren kleiner und wogen weniger als die der vergleichbaren Wildtypverpaarungen^[90]. Bei homozygoten Verpaarungen konnten darüber hinaus keine Nachkommen nachgewiesen werden^{[91][92]}. Entsprechende Daten unserer Arbeitsgruppe konnten die unerlässliche Rolle von HO-1 für die Schwangerschaft noch unterstreichen. Verpaarungen von HO-1-Wildtyp-, HO-1-heterozygoten und HO-1-homozygoten Weibchen mit HO-1-Wildtyp-, HO-1-heterozygoten und HO-1-homozygoten Männchen haben gezeigt, dass bei Abnahme der HO-1-

Expression und –Aktivität innerhalb der Verpaarung die Abortrate signifikant anstieg, was auf einen Dosis-abhängigen Effekt des HO-1 hinweist (unveröffentlichte Daten von Dr. Maria Laura Zenclussen). Bei HO-1-homozygoten Verpaarungen betrug die Abortrate 100%. Weitere Versuche deuten daraufhin, dass HO-1 darüber hinaus einen Einfluss auf die Gelbkörperbildung und die Eizellproduktion hat (unveröffentlichte Daten von Dr. Maria Laura Zenclussen). In *in vitro* Versuchen konnte unsere Arbeitsgruppe außerdem zeigen, dass HO-1 wichtig für das Überleben von Trophoblaststammzellen und deren Differenzierung in Riesenzellen ist (unveröffentlichte Daten von Dr. Maria Laura Zenclussen). *In vivo* Versuche bestätigten den schützenden Effekt von HO-1 für die Schwangerschaft. Eine entweder pharmakologisch durch Cobaltprotoporphyrin (CoPPIX) oder durch adenoviralen Gentransfer herbeigeführte Erhöhung der HO-1-Menge konnte die Abortrate im Mausabortmodell vermindern^{[93][94]}. Interessanterweise führte die Applikation von Zinkprotoporphyrin (ZnPPIX), die nachweislich die HO-1-Menge verringert, zu einer Erhöhung der Abortrate^[94]. Darüber hinaus scheint eine bidirektionale Wechselwirkung zwischen HO-1 und T_{reg}-Zellen zu existieren, da der adoptive Transfer von T_{reg}-Zellen zu erhöhten Mengen an HO-1 an der fetal-mütterlichen Grenzfläche führt und die HO-1-Hochregulierung die Anzahl an T_{reg}-Zellen steigern kann^[94]. Kürzlich gewonnene Daten unserer Arbeitsgruppe konnten diese Annahme bestätigen. Die *in vivo* Applikation von ZnPPIX bewirkte eine Erniedrigung der Anzahl an T_{reg}-Zellen sowohl systemisch als auch lokal in der Dezidua und beeinträchtigte die protektive Funktion der T_{reg}-Zellen nach adoptivem Transfer in das Abortmodell (unveröffentlichte Daten von Dr. Paul Wafula). Ferner verhinderte die *in vivo* Gabe von CoPPIX die Reifung von DZ, was im Folgenden die Generierung von T_{reg}-Zellen begünstigte (unveröffentlichte Daten von Dr. Paul Wafula).

2.6 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Regulatorische T-Zellen

T-Zellen gehören zum adaptiven Teil des Immunsystems. Sie lassen sich ganz allgemein in zytotoxische T-Zellen (CD8⁺-T-Zellen) und T-Helferzellen (CD4⁺-T-Zellen) unterteilen. Die CD4⁺CD25⁺T_{reg}-Zellen gelten als spezielle Subpopulation der T-Helferzellen. Ihre Hauptfunktion besteht in der Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen durch aktive Unterdrückung von selbstreaktiven T-Zellen^[95]. Sie spielen daher eine entscheidende Rolle bei der Hemmung von Autoimmunerkrankungen, bei der Toleranz von allogenen Organtransplantaten^{[95][96]}, bei der gastro-intestinalen Homöostase^[97] und bei der Bekämpfung von inflammatorischen Erkrankungen^[98]. Als nachteilig kann ihre Rolle bei der Bekämpfung von Krebs angesehen werden, da sie hier die Abstoßung des Tumors durch die Effektor T-Zellen beeinträchtigen^[99].

2.6.1 Phänotyp und Subtypen von regulatorischen T-Zellen

Die Geschichte der T_{reg} -Zellen lässt sich in der Literatur bis in die 70iger Jahre des 20. Jh. zurückverfolgen, als T-Lymphozyten mit suppressiven Charakter zuerst von Gershon und Kollegen als „Suppressor“ T-Zellen beschrieben wurden^[100]. Auf Grund fehlender spezifischer Marker zum damaligen Zeitpunkt sind die Untersuchungen der immunregulatorischen T-Zellen in den Hintergrund getreten. Erst im Jahr 1995 wurden die T_{reg} -Zellen von Sakaguchi und Kollegen als spezielle T-Zellsubpopulation wiederentdeckt^[95]. Heutzutage werden T_{reg} -Zellen auf Grund verschiedener Oberflächenmarker definiert (Abb. 8). Dabei dienen vor allem die α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25), der Oberflächenrezeptor Neuropilin-1 (Nrp-1)^[101] und der Transkriptionsfaktor Foxp3 zur Identifizierung und Isolierung der T_{reg} -Zellen. Allerdings kann zum heutigen Zeitpunkt nur der Transkriptionsfaktor Foxp3 als spezifischer Marker für T_{reg} -Zellen angesehen werden. Weitere von T_{reg} -Zellen exprimierte Oberflächenproteine werden auch von anderen T-Zellsubpopulationen (Effektor T-Zellen, Gedächtnis T-Zellen) exprimiert und sind daher als spezifische Marker eher ungeeignet.

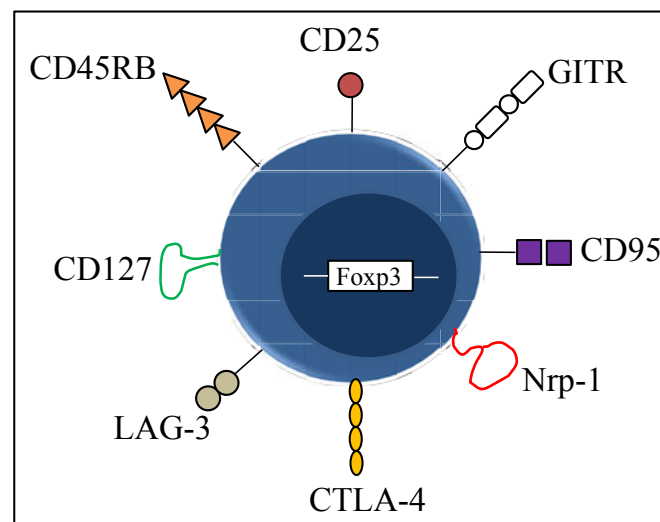


Abb. 8: Phänotyp von $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T_{reg} -Zellen. Als spezifischer Marker für T_{reg} -Zellen wurde der Transkriptionsfaktor Foxp3 beschrieben, der eine entscheidende Rolle für die Entwicklung und Funktion der T_{reg} -Zellen spielt.

Mindestens drei verschiedene Subtypen von T_{reg} -Zellen mit verschiedenen suppressiven Aktivitäten können an Hand ihres Phänotyps, der Zytokinsekretion und ihres Gewebeerksprungs unterschieden werden (Abb. 9)^[102].

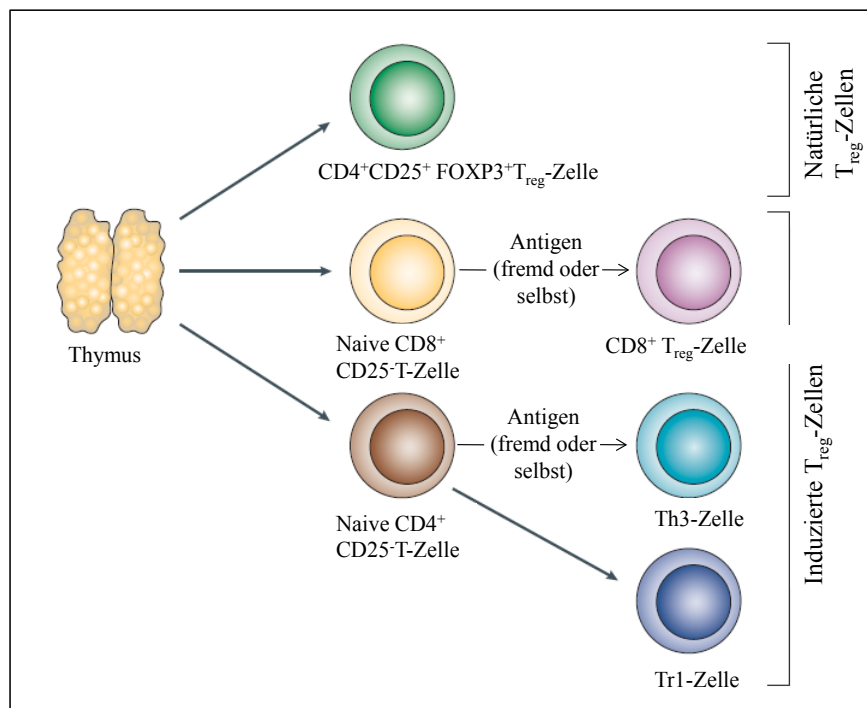


Abb. 9: Darstellung der verschiedenen Subtypen von T_{reg}-Zellen. Natürliche T_{reg}-Zellen werden im Thymus gebildet. Im Vergleich dazu entstehen induzierte T_{reg}-Zellen nach Antigenstimulation unter dem Einfluss von Zytokinen in der Peripherie. Abbildung entnommen und modifiziert aus Literaturangabe^[103].

Neben den im Thymus gebildeten natürlich vorkommenden CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T_{reg}-Zellen entstehen Typ-1 regulatorische T-Zellen (Tr1-Zellen) und T-Helferzellen 3- (Th3-) Zellen nach Antigenstimulation in der Peripherie und werden als induzierte T_{reg}-Zellen bezeichnet. CD8⁺ T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften wurden auch beschrieben, es ist jedoch wenig über ihren Ursprung, die Regulation und die Funktion bekannt^[104]. Tr1-Zellen wurden ursprünglich in einem Mausmodell für entzündliche Darmerkrankungen nachgewiesen, wo sie durch Sekretion von IL-10 inflammatorische Immunantworten effizient unterdrücken konnten^[105]. Th3-Zellen wurden zuerst im Rahmen von Untersuchungen zu oraler Toleranz identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass Th3-Zellen Immunantworten durch die Sekretion von TGF- β hemmen^[106]. Im Rahmen der Aufklärung der Toleranz in der Schwangerschaft konnte die essentielle Rolle der natürlich vorkommenden T_{reg}-Zellen bereits bestätigt werden. Darüber hinaus lassen sich Zellen mit Merkmalen der Tr1- und Th3-Zellen im Uterus nachweisen^[107]. Allerdings scheint die Präsenz der Tr1-Zellen für die erfolgreiche Schwangerschaft nicht zwingend erforderlich zu sein, da allogene Schwangerschaften in IL-10-defizienten Mäusen nicht beeinträchtigt sind^[72]. Die Bedeutung der Th3-Zellen für den Schwangerschaftsverlauf ist noch unge-

klärt. T_{reg}-Zellen stellen auf Grund ihres Phänotyps und ihrer funktionellen Charakteristika eine eigene zelluläre Linie neben den Th1-, Th2- und Th17-Zellen dar. Sie repräsentieren 1-3 % der CD4⁺-T-Zellpopulation im Menschen und 5-10 % der CD4⁺-T-Zellpopulation in Mäusen^{[108][109]}.

2.6.2 Der Transkriptionsfaktor Foxp3 als spezifischer Marker für Maus-T_{reg}-Zellen

Als bis heute einziger spezifischer Marker für Maus-T_{reg}-Zellen ist der Transkriptionsfaktor Foxp3 beschrieben worden. Beim Menschen ist die Frage nach der Spezifität der Foxp3-Expression für T_{reg}-Zellen noch ungeklärt. Eine transiente Foxp3-Expression konnte nach *in vitro* Stimulation auch in aktivierten T-Zellen nachgewiesen werden, die keinen regulatorischen Phänotyp besitzen. Allerdings weisen nur humane T_{reg}-Zellen eine stabile Foxp3-Expression auf^[110]. Der T_{reg}-Zellmarker konnte durch eine Genmutation identifiziert werden, die im Menschen zu einem schweren X-chromosomal bedingten Syndrom führt, welches mit Störungen des Immunsystems, Polyendokrinopathie und Enteropathie (IPEX) assoziiert ist. Bei der „Scurfy“-Maus konnten bei einer Mutation im homologen Gen ähnliche Symptome festgestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die für die schwere Immun-

pathologie verantwortliche Mutation in einem Gen lag, welches den Transkriptionsfaktor Forkhead Box P3 (Foxp3 oder Scurfin) aus der Familie der „Forkhead/Winged-Helix-Proteine“ kodiert^[111]. Fontenot und Kollegen konnten als Erste die Foxp3-Expression mit der Entwicklung und Funktion der T_{reg}-Zellen assoziieren. Sie fanden heraus, dass die foxp3 mRNA in suppressiven CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten erhöht ist und dass Foxp3-defiziente Mäuse keine T_{reg}-Zellen haben^[112]. Die Entdeckung des Transkriptionsfaktors war ein Meilenstein in der Geschichte der T_{reg}-Zellen und hat in den letzten Jahren die Untersuchung dieser speziellen T-Zellsubpopulation bei verschiedenen Erkrankungen und in der Schwangerschaft erheblich erleichtert.

2.6.3 Entstehung der T_{reg}-Zellen im Thymus und in der Peripherie

Natürlich vorkommende T_{reg}-Zellen entstehen durch einen selektiven Prozess im Thymus, der auf der Struktur ihres individuellen T-Zellrezeptors (TZR) basiert (Abb. 10)^{[113][114]}.

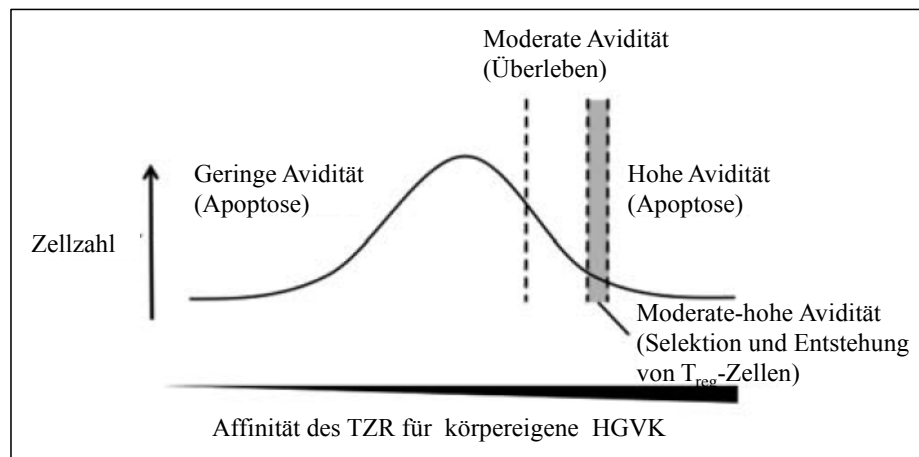


Abb. 10: Darstellung der Entstehung von natürlich vorkommenden T_{reg} -Zellen im Thymus. Die Entstehung von T_{reg} -Zellen im Thymus basiert auf einer veränderten Negativselektion. T_{reg} -Zellen entstehen, wenn die Affinität der naiven T-Zelle zum MHC/Selbstantigen-Komplex etwas schwächer ist als bei der Negativselektion, sich aber an der Grenze zur Positivselektion befindet. Abbildung entnommen und modifiziert aus Literaturangabe^[115].

Abhängig von der Avidität der Interaktion zwischen dem TZR einer individuellen T-Zelle und dem MHC/Selbstantigen-Komplex, der von thymalen Stromazellen exprimiert wird, findet eine positive (moderate Avidität) oder negative (geringe oder hohe Avidität) T-Zellselektion statt^[116] (Abb. 10). Diese Selektion wird als zentrale Toleranz bezeichnet und trägt entscheidend dazu bei, Autoimmunerkrankungen vorzubeugen. Als weiterer Schutzmechanismus gegen Autoimmunerkrankungen werden bei der peripheren Toleranz gefährliche T-Zellen unterdrückt, die der Selektion im Thymus entgangen sind. Die periphere Toleranz wird dabei in erster Linie durch T_{reg} -Zellen vermittelt. Die Entstehung von T_{reg} -Zellen im Thymus basiert auf der Vorstellung einer veränderten Negativselektion. Dabei geht man davon aus, dass T_{reg} -Zellen generiert werden, wenn die Affinität der naiven T-Zelle zum MHC/Selbstantigen-Komplex etwas schwächer ist als bei der Negativselektion, sich aber an der Grenze zur Positivselektion befindet (Abb. 10). Zusätzlich zu den im Thymus gebildeten natürlich vorkommenden T_{reg} -Zellen entstehen induzierte T_{reg} -Zellen durch *de novo*-Generierung aus naiven T-Zellen oder durch Expansion des schon existierenden T_{reg} -Zellpools in der Peripherie^{[117][118]}. Hierbei spielen Gewebeantigene eine entscheidende Rolle, um antigenspezifische T_{reg} -Zellen aus naiven T-Zellen zu generieren^[117]. Die stetige TZR-Stimulation durch geringe Mengen an Antigenen führt dabei zur Expression von Foxp3 in naiven T-Zellen und zur Ausbildung eines suppressiven Phänotyps dieser Zellen^[119]. Gegensätzliche Beobachtungen zur Proliferation der T_{reg} -Zellen konnten in diesem Zusammenhang zwischen *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen gemacht werden. T_{reg} -Zellen verhalten sich

in vitro nach wiederholter TZR-Stimulierung anerg, wohingegen adoptive Transferexperimente gezeigt haben, dass diese Zellen *in vivo* proliferieren können^{[120][121][122]}. Der Weg der peripheren T_{reg}-Zellgenerierung ermöglicht die Entstehung von T_{reg}-Zellen gegen spezielle Gewebeantigene, die von den Stromazellen im Thymus nicht präsentiert werden. Dies ermöglicht eine periphere Regulation von Immunantworten, die gegen ungefährliche körperfremde Antigene gerichtet sind. Dieser Aspekt ist besonders entscheidend für die Schwangerschaft, da hier T_{reg}-Zellen in der Mutter generiert werden können, die gegen väterliche Antigene des Samens oder des Feten gerichtet sind und im Folgenden den Fetus vor Übergriffen durch alloreaktive T-Zellen schützen können.

2.6.3.1 Einfluss von Dendritischen Zellen und Zytokinen auf die T_{reg}-Zellentstehung

In der Literatur wurden verschiedene zelluläre und molekulare Mechanismen beschrieben, die zur T_{reg}-Zellgenerierung beitragen. Die Entstehung und Aktivierung von T_{reg}-Zellen setzt wie bei allen T-Zellen eine Präsentation von Antigenen durch APZ wie Makrophagen und DZ voraus. Zur erfolgreichen Aktivierung von CD4⁺ oder CD8⁺ Effektor T-Zellen müssen DZ einen reifen Phänotyp aufweisen, der durch die Expression von MHC I- oder MHC II-Antigen-Komplexen und kostimulatorischen Molekülen wie CD80 oder CD86 gekennzeichnet ist. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass tolerogene DZ, die durch einen unreifen oder semi-reifen Phänotyp (verringerte Expression von kostimulatorischen Molekülen und MHC II-Molekülen) charakterisiert sind, effektiv die Expansion von T_{reg}-Zellen induzieren^[123]. Für die DZ-Differenzierung scheint die Anwesenheit von immunsuppressiven Zytokinen eine wichtige Rolle zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass TGF-β und IL-10 sowie der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende-Faktor (GM-CSF) und IL-4 die Reifung der DZ hemmen und somit zur T_{reg}-Zellexpansion beitragen^[124]. Darüber hinaus exprimieren tolerogene DZ IDO, was zum einen zu einer Aktivierung von ruhenden T_{reg}-Zellen führt und zum anderen die Konvertierung von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T_{reg}-Zellen unterstützt^{[125][126]}. Die direkte Interaktion zwischen T_{reg}-Zellen und tolerogenen DZ könnte zur übergreifenden Toleranz beitragen, da T_{reg}-Zellen ihrerseits die DZ konditionieren IDO zu exprimieren und somit benachbarte T-Zellen in T_{reg}-Zellen umgewandelt werden^{[127][128]}. Als weiteres Zytokin für die T_{reg}-Zellgenerierung ist IL-2 zu benennen. Während hohe Konzentrationen an IL-2 die suppressive Kapazität der T_{reg}-Zellen blockieren, sind geringe IL-2-Mengen unverzichtbar für deren Entwicklung und Aufrechterhaltung^[129]. Daneben beeinflussen auch IL-15, -7 und -4 die Generierung, das Wachstum und das Überleben der T_{reg}-Zellen^{[130][131][132]}. Ein Schlüsselfaktor für die T_{reg}-Zellentwicklung und -funktion ist TGF-β, ein Zytokin mit suppressiven und anti-inflammatorischen Eigenschaften^[133]. In Anwesenheit von TGF-β

induzieren naive $CD4^+CD25^-$ T-Zellen nach TZR-Stimulierung ihre Foxp3-Expression und differenzieren sich zu T-Zellen mit einem suppressiven Phänotyp^[134]. In der Schwangerschaft sezerniert der Tropho-blast TGF- β und IL-10^{[135][136]}, die im Folgenden eine Anreicherung von tolerogenen DZ an der fetal-mütterlichen Grenzfläche begünstigen und somit die T_{reg} -Zellgenerierung vor Ort unterstützen.

2.6.4 Funktionen der T_{reg} -Zellen

Trotz intensiver Forschung sind die Mechanismen und Faktoren, über die T_{reg} -Zellen ihre suppressive Funktion vermitteln, noch immer nicht vollständig geklärt. T_{reg} -Zellen verfügen über ein großes Zielspektrum und verwenden in Abhängigkeit von der Spezies und vom Zielgewebe verschiedene Wege der Immunsuppression. Sie hemmen die Proliferation und Zytokinsekretion von $CD4^+$ - und $CD8^+$

T-Zellen^[137], unterdrücken die Proliferation von B-Zellen und deren AK-Produktion^[138] und inhibieren die zytotoxische Funktion von NK-Zellen^[139]. Darüber hinaus interagieren T_{reg} -Zellen mit MZ^[62] und hemmen die Reifung und Funktion von DZ und Makrophagen^{[140][141][142]}. An Hand vielfältiger Interaktionen mit verschiedenen Zelltypen können T_{reg} -Zellen unterschiedliche Stadien von Immunantworten des angeborenen und erworbenen Immunsystems beeinflussen und somit das Auftreten von Krankheiten verhindern bzw. deren pathologischen Verlauf eindämmen. Bezüglich der Funktion der T_{reg} -Zellen konnten mehrere Hauptmechanismen beschrieben werden (Abb. 11).

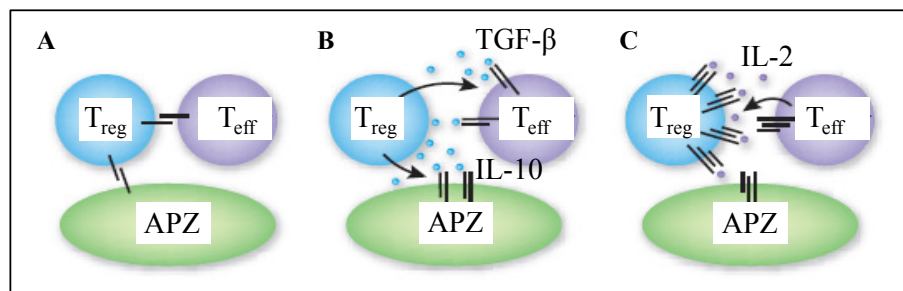


Abb. 11: Darstellung der Hauptmechanismen zur Erklärung der T_{reg} -Zell-vermittelten Toleranz. T_{reg} -Zellen vermitteln ihre immunsuppressive Funktion entweder durch direkten Zell-Zell-Kontakt (A), durch die Sekretion von immunsuppressiven Zytokinen (B) oder durch Konkurrenz um den Überlebensfaktor IL-2 (C). Abbildung entnommen und modifiziert aus Literaturangabe^[143].

Generell vermitteln T_{reg} -Zellen ihre immunsupprimierende Funktion entweder direkt über Zell-Zell-Kontakt oder indirekt über die Sekretion von anti-inflammatorischen Zytokinen. Taylor und Mitarbei-

ter beschrieben, dass die Interaktion des Zytotoxischen T-Lymphozyten Antigens-4 (CTLA-4) auf T_{reg}-Zellen mit seinen Liganden CD80/CD86 auf aktivierten T-Zellen die weitere Aktivierung der Effektor T-Zellen verhindert^[144]. Bei Bindung von CTLA-4 an CD80/CD86 auf APZ (DZ) wird die Bildung vonIDO und pro-apoptotischen Metaboliten in den DZ induziert^{[145][146]}. IDO ist am Abbau von Tryptophan beteiligt, einer für T-Zellen essentiellen Aminosäure. Munn und Kollegen sowie Lee und Kollegen konnten *in vitro* mittels menschlicher Proben und Mausproben zeigen, dass reduzierte Mengen an Tryptophan die weitere Aktivierung von Effektor T-Zellen einschränken^{[147][148]}. Des Weiteren wurde im Maussystem beschrieben, dass T_{reg}-Zellen in Abhängigkeit vom Reifungszustand der DZ die Expression von CD80/CD86 herunterregulieren können. Fehlende kostimulatorische Signale bei der Interaktion zwischen APZ und konventionellen T-Zellen bedingen den Übergang der T-Zellen in einen Ruhezustand (Anergie)^[149]. Weitere Interaktionen zwischen membrangebundenem TGF- β und dem Lymphozyten-Aktivierungsgen 3 (LAG-3) auf Maus-T_{reg}-Zellen^{[150][151][152][153]} mit den entsprechenden Gegenspielern auf Effektor T-Zellen unterdrücken deren Funktion und Proliferation (Abb.11A). Bei der indirekten Immunsuppression sezernieren T_{reg}-Zellen IL-10 und TGF- β und inhibieren die Proliferation und Funktion der Effektor T-Zellen (Abb. 11B)^{[154][155]}. Diese Form der T_{reg}-Zellfunktion scheint vorwiegend *in vivo* eine Rolle zu spielen, da *in vitro* Experimente mit menschlichen Proben und Mausproben zeigen konnten, dass weder IL-10 noch TGF- β essentiell für die Funktion der T_{reg}-Zellen sind^[109]. Als weiterer Mechanismus der indirekten Immunsuppression wurde ein Modell vorgeschlagen, bei dem T_{reg}-Zellen mit Effektor T-Zellen um den Proliferations- und Überlebensfaktor IL-2 konkurrieren. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass T_{reg}-Zellen durch Expression eines hochaffinen IL-2-Rezeptors den Effektor T-Zellen das IL-2 streitig machen und somit deren Überlebenschancen vermindern. Dieser Weg gilt als effizienter Suppressionsmechanismus der T_{reg}-Zellen *in vitro*^[156]. Für die T_{reg}-Zellfunktion *in vivo* kann dieser Mechanismus jedoch in Frage gestellt werden, da IL-2-defiziente Mäuse schwere Autoimmunerkrankungen entwickeln und IL-2 daher nicht unverzichtbar für die T-Zellproliferation zu sein scheint (Abb. 11C). Als Einzigartigkeit der T_{reg}-Zellen kann die Fähigkeit zur Übertragung der Suppressivität auf andere Zelltypen angesehen werden^[157]. So können T_{reg}-Zellen einen tolerogenen Phänotyp in DZ induzieren^[158] oder die Expression von IL-10 in T-Zellen hervorrufen^[159]. Dieser Prozess ist vor allem für die Toleranzerzeugung in der Schwangerschaft von entscheidender Bedeutung, da hier verschiedene väterliche Antigene, die mit dem Samen oder dem sich entwickelnden fetalen Gewebe assoziiert sind, auftreten.

2.7 Die Rolle von CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T_{reg}-Zellen für die Etablierung und den Verlauf der Schwangerschaft

Während der Schwangerschaft wächst der *semiallogene* Fetus im mütterlichen Uterus heran ohne abgestoßen zu werden. Dabei erkennt das mütterliche Immunsystem den Fetus und toleriert ihn. In den letzten Jahrzehnten haben sich T_{reg}-Zellen als wichtige Immunregulatoren bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der mütterlichen Toleranz gegenüber dem Fetus herauskristallisiert.

2.7.1 T_{reg}-Zellen in der Schwangerschaft bei Mensch und Maus

T_{reg}-Zellen expandieren sowohl systemisch als auch direkt an der fetal-mütterlichen Grenzfläche (lokal) in frühen Stadien einer normal verlaufenden menschlichen Schwangerschaft^{[160][161]}. Dagegen konnte gezeigt werden, dass die Expression von Foxp3 im Endometrium bei infertilen Frauen im Vergleich zu normal schwangeren Frauen in frühen Schwangerschaftsstadien reduziert ist^[162]. Die Anzahl an T_{reg}-Zellen bei Patientinnen mit Spontanaborten gegenüber normal schwangeren Frauen ist ebenfalls vermindert^[163]. Diese Beobachtung konnte von Arruvito und Kollegen kürzlich bestätigt werden. Die Autoren wiesen eine Assoziation zwischen einer reduzierten Anzahl an T_{reg}-Zellen und dem Auftreten von habituellen Aborten nach und konnten darüber hinaus zeigen, dass eine väterliche Alloimmunisierung die T_{reg}-Zellzahl erhöhen kann^[164]. In weiteren Untersuchungen konnten sie außerdem demonstrieren, dass eine Expansion von T_{reg}-Zellen in der Dezidua bei normal schwangeren Frauen mit einer geringen Anzahl an Th17-Zellen einhergeht. Sie schlugen vor, dass T_{reg}-Zellen die Aktivität von Th1-Zellen regulieren, die lokal in der normalen Schwangerschaft auftreten^[165]. Widersprüchliche Daten existieren bezüglich einer Assoziation zwischen der Anzahl und Funktion der T_{reg}-Zellen und dem Auftreten von Präeklampsie in der Spätschwangerschaft^{[166][167][168][169][170]}.

Entsprechend den Beobachtungen bei der menschlichen Schwangerschaft expandieren T_{reg}-Zellen auch in der schwangeren Maus sowohl systemisch als auch lokal^{[171][172]}. Verschiedene Studien konnten einen Anstieg an T_{reg}-Zellen bereits am Tag 2 der Mausschwangerschaft in Blut, Lymphknoten und Thymus belegen. Ab Mitte der Schwangerschaft ist ein Abfall der T_{reg}-Zellzahl zu beobachten und zum Zeitpunkt der Geburt bzw. unmittelbar danach entspricht die Anzahl der T_{reg}-Zellen der einer nicht schwangeren Maus^{[171][172][173]}. Eine Assoziation zwischen einer reduzierten Anzahl an T_{reg}-Zellen und dem Auftreten von Spontanaborten konnte auch bei der Maus nachgewiesen werden^{[172][173]}. Demnach spielen T_{reg}-Zellen für den erfolgreichen Verlauf der Schwangerschaft sowohl beim Menschen als auch bei der Maus eine entscheidende Rolle.

2.7.2 Generierung und Antigenspezifität von T_{reg}-Zellen in der Schwangerschaft

Entsprechend den schon beschriebenen Mechanismen zur Generierung von T_{reg}-Zellen geht man in der Schwangerschaft vom Auftreten beider Subpopulationen, von den im Thymus gebildeten natürlich vorkommenden T_{reg}-Zellen und von den in der Peripherie induzierten T_{reg}-Zellen aus. Zoller und Kollegen haben gezeigt, dass die in der Schwangerschaft stattfindende Involution des Thymus mit einer reduzierten Proliferation an CD4⁺CD8⁺ doppelt positiven und doppelt negativen Thymozyten und mit einer Akkumulation von T_{reg}-Zellen im Thymus einhergeht^[174]. Unsere Arbeitsgruppe konnte ebenfalls zeigen, dass die Anzahl an T_{reg}-Zellen im Thymus von schwangeren Mäusen gegenüber nicht schwangeren Mäusen ansteigt und dass dieser Anstieg in Abortmäusen beeinträchtigt ist^[172]. Verschiedene Studien konnten eine Gewichtszunahme der lokalen Lymphknoten während der Schwangerschaft feststellen^{[175][176][177]}. Zhao und Kollegen vermuten, dass die lokalen Lymphknoten den Hauptort der T_{reg}-Zellkonversion darstellen, da hier sowohl in syngenischen als auch in allogenen Schwangerschaften erhöhte T_{reg}-Zellzahlen auftreten^[178]. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass sowohl natürlich vorkommende T_{reg}-Zellen als auch induzierte T_{reg}-Zellen eine Rolle in der Schwangerschaft spielen. Obwohl die Expansion der T_{reg}-Zellen in den letzten Jahrzehnten in verschiedenen Schwangerschaftsmodellen eingehend untersucht wurde, sind die Mechanismen und Faktoren, die den Anstieg der T_{reg}-Zellen bedingen, noch weitgehend ungeklärt. In diesem Zusammenhang haben Aluvihare und Kollegen eine Antigen-unabhängige Expansion der T_{reg}-Zellen vorgeschlagen, da sie einen Anstieg an T_{reg}-Zellen sowohl in syngenischen als auch in allogenen Schwangerschaften beobachten konnten^[171]. Auf Grund starker hormonaler Veränderungen in der Schwangerschaft vermuteten sie einen Einfluss von Hormonen auf die Expansion der T_{reg}-Zellen. Diese Annahme konnte durch eine Studie unterstützt werden, in der gezeigt wurde, dass Östrogen in physiologischen Mengen nicht nur zur Expansion von T_{reg}-Zellen beiträgt, sondern auch *in vitro* die Konversion von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in T_{reg}-Zellen bewirkt^[179]. Auch scheint sich das Hormon Prostaglandin E₂ (PGE₂) auf die Generierung und Funktion der T_{reg}-Zellen auszuwirken. *In vitro* Experimente konnten zeigen, dass PGE₂ die hemmende Kapazität von humanen T_{reg}-Zellen erhöht und CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in T-Zellen mit regulatorischen Phänotyp umwandelt^[180]. Im Gegensatz dazu haben Zhao und Kollegen gezeigt, dass weder Östrogen noch Progesteron alleine oder in Kombination die Anzahl an T_{reg}-Zellen in ovariectomierten Mäusen beeinflussen können, was eher einen Einfluss von väterlichen Antigenen auf den T_{reg}-Zellanstieg nahe legt^[178]. Dieselben Autoren konnten darüber hinaus höhere Mengen von T_{reg}-Zellen in allogenen Schwangerschaften gegenüber syngenischen Schwangerschaften nachweisen. Man ist lange davon ausgegangen, dass fetale Zellen und Antigene die plazentale Barriere nicht überqueren können. Heutzutage weiß man

jedoch, dass der bidirektionale Zelltransfer (Mikrochimerismus) sowohl in der menschlichen Schwangerschaft als auch in der Mausschwangerschaft stattfindet^{[33][35][181][182][183]}. Der Mikrochimerismus stellt ein normales Phänomen dar und kindliche Zellen können über viele Jahre hinweg in der Mutter nachgewiesen werden, was mit dem Auftreten von mütterlichen Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht wurde^[184]. Khosrotehrani und Kollegen beschrieben die Anwesenheit von väterlichen Antigenen in mütterlichen Organen in allen Stadien der Schwangerschaft in der Maus^[34]. Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich zeigen, dass väterliche Antigene unmittelbar nach der Insemination in fast allen mütterlichen Organen anzutreffen sind^[49]. Ungeklärt ist bis jetzt jedoch, ob die Präsentation der Antigene direkt durch väterliche APZ oder indirekt durch mütterliche APZ vermittelt wird^[39]. Moldenhauer und Kollegen konnten an Hand ihrer Experimente zeigen, dass Antigene der Samenblasenflüssigkeit, welche durch mütterliche APZ präsentiert wurden, die Aktivierung und Expansion von väterlichen antigenreaktiven CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bedingten^[29]. Neueste Resultate unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass T_{reg}-Zellen nach Verpaarung mit vasktomierten Männchen, aber nicht nach mechanisch induzierter Pseudoschwangerschaft systemisch ansteigen^[136]. Da die Präsentation der väterlichen Antigene in den mütterlichen lymphoiden Geweben zeitgleich mit der Expansion der T_{reg}-Zellen stattfindet, ist zu vermuten, dass die väterlichen Antigene, die früh in der Schwangerschaft prozessiert werden zur Expansion der T_{reg}-Zellen beitragen. Allerdings ist noch nicht geklärt, welche väterlichen Antigene hierfür verantwortlich sind. Diese Fragestellung wird im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht. Neben den väterlichen Antigenen, die kurz nach der Kopulation zum Anstieg der T_{reg}-Zellen beitragen, geht man davon aus, dass die kontinuierliche Freisetzung von fetalen Antigenen aus der Plazenta den T_{reg}-Zellspiegel im Verlauf der Schwangerschaft aufrechterhält und somit die Toleranz gegenüber dem Fetus bis zur Geburt gewährleistet. Weitere Hinweise auf eine Antigenspezifität von T_{reg}-Zellen in der Schwangerschaft kommen von einer Studie, die zeigen konnte, dass T_{reg}-Zellen aus dem Blut von schwangeren Frauen, jedoch nicht von nicht schwangeren Frauen, effektiv Alloantigen-Antworten *in vitro* unterdrücken konnten^[185]. Aluvihare und Kollegen zeigten, dass in der Maus allogene Feten nach Depletion von CD25⁺ T-Zellen (T_{reg}-Zellen) abgestoßen wurden, syngene Feten jedoch nicht^[171]. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Darrasse-Jéze und Kollegen, die nachwiesen, dass *semiallogene* Schwangerschaften in Mäusen die Expansion von T_{reg}-Zellen, aber nicht von aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in lokalen Lymphknoten induzierten^[186]. Die Gabe eines anti-CD25-AK vor der Verpaarung der Mäuse bewirkte eine Depletion der T_{reg}-Zellen, was zu einer Expansion von aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in den lokalen Lymphknoten, zu einer beeinträchtigten Implantation und letztendlich zur fetalen Abstoßung führte^{[172][186]}. Alle gewonnenen Daten aus ver-

schiedenen Spezies und Modellen zeigen deutlich, dass während der Schwangerschaft eine antigenspezifische Immunantwort stattfindet und dass T_{reg}-Zellen dabei eine zentrale Rolle spielen.

2.7.3 Adoptiver Transfer von T_{reg}-Zellen in das immunologische Abortmodell

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Abortverpaarung CBA/J x DBA/2J gegenüber der Normalschwangerschaftsverpaarung CBA/ x BALB/c signifikant weniger T_{reg}-Zellen sowohl systemisch als auch lokal zu allen Schwangerschaftszeitpunkten aufweist^{[172][173]}. Mittels adoptiven Transfers von T_{reg}-Zellen aus normal schwangeren Mäuseweibchen in Abortweibchen am Anfang der Schwangerschaft (Tag 0, 1 oder 2) konnte das Auftreten von Aborten vollständig verhindert werden^{[136][172]} (Daten aus meiner Diplomarbeit). Die Beobachtung, dass ausschließlich T_{reg}-Zellen aus normal schwangeren Weibchen (Tag 14 der Schwangerschaft) und nicht T_{reg}-Zellen aus nicht schwangeren Weibchen einen schützenden Effekt auf den Schwangerschaftsverlauf hatten, ließ zunächst vermuten, dass entweder schwangerschaftsassozierte Faktoren wie Hormone oder väterliche Antigene einen positiven Einfluss auf die T_{reg}-Zellen ausüben. Da die Männchen aus beiden Verpaarungen (BALB/c und DBA/2J) die gleichen Hauptgewebeverträglichkeitsantigene (H2^d) tragen und sich nur in den Nebengewebeverträglichkeitsantigenen unterscheiden, lag die Vermutung nahe, dass T_{reg}-Zellen während der Schwangerschaft antigenspezifisch agieren, nachdem Unterschiede in den Hormonmengen zwischen beiden Verpaarungen ausgeschlossen werden konnten^[136]. Diese Annahme konnte im Rahmen meiner Diplomarbeit bestätigt werden, weil T_{reg}-Zellen aus einer Verpaarung mit abweichenden Hauptgewebeverträglichkeitsantigenen (H2^b; *third-party*-Kombination) nach adoptiven Transfer in die Abortmäuse die Abortrate nicht senken konnten^[136]. Die Antigenspezifität der transferierten T_{reg}-Zellen und die Fähigkeit ihre suppressive Kapazität auf fremde Nebengewebeverträglichkeitsantigene („linked immunosuppression“) zu übertragen, konnte durch einen weiteren Versuch bewiesen werden. Hierbei wurden CBA/J-Weibchen (H2^k) zunächst mit BALB/c-Antigenen (H2^d) vakziniert bevor sie anschließend mit DBA/2J-Männchen (H2^d) verpaart wurden. Die Vakzinierung bewirkte eine Reduktion der Abortrate in den Abortweibchen, die mit einer Generierung von T_{reg}-Zellen assoziiert war. Um zu bestätigen, dass die T_{reg}-Zellen antigenspezifisch und funktionell aktiv waren, wurden sie aus den vakzinierten schwangeren CBA/J-Weibchen (Tag 14 der Schwangerschaft) isoliert und erneut in die Abortkombination transferiert. Der Transfer konnte die fetale Abstoßung verhindern^{[136][187]}. Es konnte demnach gezeigt werden, dass die Vakzinierung mit väterlichen H2^d-Antigenen im Verlauf der Schwangerschaft (14 Tage) eine Generierung von H2^d-antigenspezifischen schützenden T_{reg}-Zellen

bewirkte, die nach ihrem Transfer in die Abortkombination die Abstoßung der H2^d/H2^k-positiven Fetten verhinderten.

2.7.4 Mechanismen der T_{reg}-Zellen in der Schwangerschaft beim Menschen und bei der Maus

Trotz intensiver Studien zur Funktion der T_{reg}-Zellen sind die genauen Mechanismen, wie T_{reg}-Zellen den Fetus schützen, noch weitgehend ungeklärt. Es wird angenommen, dass T_{reg}-Zellen durch eine Vielzahl von Mechanismen, die miteinander kooperieren, zum fetalen Schutz beitragen. Untersuchungen zur Funktion der antigenspezifischen T_{reg}-Zellen im Mausabortmodell konnten zeigen, dass T_{reg}-Zellen zum Aufbau eines toleranten Mikromilieus an der fetal-mütterlichen Grenzfläche beitragen, welches durch erhöhte Mengen der immunregulatorischen Moleküle TGF-β, HO-1 und LIF charakterisiert ist^[188]. Die protektive Rolle der T_{reg}-Zellen in diesem Modell wurde auch von anderen Forschergruppen bestätigt^{[189][190][191]}. Jin und Kollegen wiesen nach, dass die Injektion von anti-B7-1/-2-AK in schwangere CBA/J-Weibchen die Generierung von T_{reg}-Zellen induzierte, welche eine Reduzierung der Abortrate bewirkten^[189]. Die Gabe von Cyclosporin A (CsA) in Abortweibchen induzierte die Expression des T_{reg}-Zell-assoziierten Moleküls CTLA-4 sowie die Expression von kostimulatorischen Molekülen wie CD80/CD86 an der fetal-mütterlichen Grenzfläche. Die Behandlung der Abortweibchen mit CsA konnte die Abortrate ebenfalls signifikant senken^[190]. Weitere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe lassen darauf schließen, dass T_{reg}-Zellen durch Induktion des schwangerschaftsfördernden Enzyms HO-1 die Toleranz gegenüber dem Fetus unterstützen^[188]. Die Hemmung von HO-1 durch Gabe von Zn-PPIX hob den schützenden Effekt der T_{reg}-Zellen auf, was darauf hinweist, dass T_{reg}-Zellen ihre Funktion zumindest teilweise über HO-1 vermitteln (unveröffentlichte Daten von Dr. Paul Wafula). Die Blockierung von T_{reg}-Zell-assoziierten Molekülen wie dem Programmierten Zelltod-1 (PD-1) oder CTLA-4 mittels AK, führte im Fall des PD-1 zur Aufhebung des schützenden Effektes der T_{reg}-Zellen, zeigte jedoch für CTLA-4 keinen Effekt auf die T_{reg}-Zellfunktion^[192]. Im Gegensatz dazu konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass eine Behandlung mit anti-CTLA-4-AK die T_{reg}-Zellfunktion *in vivo* inhibieren konnte^[193]. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die Anzahl an CTLA-4 exprimierenden T_{reg}-Zellen in Patientinnen mit Fehlgeburten der Menge von nicht schwangeren Frauen entspricht, wohingegen normal schwangere Frauen erhöhte Mengen aufwiesen. Diese Tatsache lässt darauf schließen, dass CTLA-4 exprimierende T_{reg}-Zellen die fetale Abstoßung verhindern können^[163]. Eine Immunregulierung über PD-1 wird durch ein Experiment bekräftigt, in welchem, Mäuse, die defizient für den Liganden von PD-1 (PDL-1) sind, erhöhte Abortraten in allo-

genen, aber nicht in syngen Verpaarungen zeigen^[194]. In Menschen wird PDL-1 vom Trophoblasten exprimiert^[195]. Demnach könnte der Trophoblast die T_{reg}-Zellfunktion über die Interaktion zwischen PD-1/PDL-1 beeinflussen, um somit den Angriffen des mütterlichen Immunsystems zu entgehen. Weitere Studien sprechen auch für eine direkte Interaktion zwischen T_{reg}-Zellen und DZ in der Schwangerschaft^{[50][196]}. In diesem Zusammenhang konnte unsere Arbeitsgruppe nachweisen, dass HO-1 für die Aufrechterhaltung eines tolerogenen Phänotyps in DZ wichtig ist, was im Folgenden zur Generierung von T_{reg}-Zellen beiträgt (unveröffentlichte Daten von Dr. Paul Wafula). Neueste Erkenntnisse lassen auch eine Interaktion zwischen T_{reg}-Zellen und MZ in der Schwangerschaft vermuten. Gari und Kollegen haben demonstriert, dass T_{reg}-Zellen die Degranulation von MZ inhibieren^[197]. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass der durch antigenspezifische T_{reg}-Zellen bedingte fetale Schutz mit einer Erhöhung an MZ und deren assoziierten Molekülen wie den Mastzellproteasen 1 und 5 (Mcpt-1/-5) an der fetal-mütterlichen Grenzfläche einhergeht (unveröffentlichte Daten von Dr. Milan Popovic). Die Hemmung von IL-10 mittels AK nach adoptivem Transfer der T_{reg}-Zellen in die Abortmäuse hob den schützenden Effekt der T_{reg}-Zellen auf und bewirkte gleichzeitig eine Abnahme von Mcpt-1, sodass IL-10 möglicherweise als MZ-Regulator an der fetal-mütterlichen Grenzfläche fungiert (unveröffentlichte Daten von Dr. Milan Popovic). Die Blockierung von TGF- β konnte im Gegensatz zur Blockierung von IL-10 den schützenden T_{reg}-Zelleffekt in der Abortverpaarung nicht beeinträchtigen^[136]. Eine untergeordnete Rolle von TGF- β für die T_{reg}-Zellfunktion ließ sich auch in einer Studie nachweisen, in der gezeigt wurde, dass die relative Menge der TGF- β 1-, 2- und 3-Expression im Endometrium von infertilen Frauen mit einer reduzierten Foxp3-Expression nicht verändert war^[162]. Im Gegensatz dazu wird IL-10 in der Schwangerschaft hochreguliert und ist in Frauen mit habituellem Abortgeschehen im Uterus reduziert^{[198][199]}. Weitere Studien sind jedoch notwendig, um genauer zu klären, in welchem Umfang die unterschiedlichen Subtypen der T_{reg}-Zellen, die hohe Mengen an IL-10 (Tr1) oder TGF- β (Th3) produzieren, in die fetalen Schutzmechanismen involviert sind. Zusätzlich zu den hier erwähnten Mechanismen kann vermutet werden, dass T_{reg}-Zellen ihre protektive Funktion auch noch über andere Wege vermitteln.

2.8 Humanes Choriongonadotropin in der Schwangerschaft

2.8.1 Struktur, Vorkommen und Rezeptorbindung

Das Schwangerschaftshormon hCG gehört zur Familie der Glykoproteinhormone wie LH, FSH und das Thyroid-stimulierende Hormon (TSH). Diese Hormone bestehen aus zwei Untereinheiten, die nicht-kovalent miteinander verbunden sind. Die α -Untereinheit ist bei allen Mitgliedern dieser Familie

gleich, wohingegen die β -Untereinheit durch verschiedene Gene kodiert wird^[200]. Die β -hCG-Untereinheit ist die größte β -Untereinheit, da sie einen längeren glykosylierten Teil enthält. Die zusätzliche Glykosylierung ermöglicht eine höhere Stabilität und schnellere Sekretion des hCG-Moleküls. HCG wird von sechs unterschiedlichen, aber sehr ähnlichen Genen kodiert, die zusammen mit der β -Untereinheit des LH auf Chromosom 19 lokalisiert sind^[201]. β -hCG1 und 2 wurden als Pseudogene beschrieben^{[202][203]}. In der Schwangerschaft und in Keimzelltumoren treten vor allem die Isoformen β -hCG 3, 5 und 8 auf, welche alle ein identisches Protein kodieren. Im Gegensatz dazu kodiert β -hCG7 für ein Protein, welches sich in drei Aminosäuren von den anderen unterscheidet und in geringen Mengen in normalem nicht-malignen Gewebe exprimiert wird^{[202][204][205]}. Die Homologie zwischen hCG und LH liegt bei 96 % und ermöglicht die Bindung beider Hormone an den gleichen Rezeptor, den LH/CG-Rezeptor. Allerdings ist die Bindungsaffinität des hCG 4-5fach höher als die des LH. HCG kommt nur im Menschen und bei Primaten vor^{[206][207][208][209][210]}, ist in Rindern oder Nagern jedoch nicht nachweisbar^{[209][211]}. Auf Grund ihrer sehr ähnlichen Struktur sind hCG und LH bezüglich ihrer biologischen Aktivität austauschbar und hCG wird bereits in vielen Fällen in der Klinik als Ersatz für LH eingesetzt, um zum Beispiel den Eisprung in Frauen zu induzieren oder die Testosteronproduktion in Männern anzuregen. In Tierexperimenten wird hCG ebenfalls erfolgreich zur Superovulation bei Nagern eingesetzt. Dies ermöglicht das Studium von Funktionen des hCG im Maussystem und die Übertragung der Erkenntnisse auf den Menschen. HCG ist eines der ersten Moleküle, das vom Embryo kurz nach der Befruchtung gebildet wird und wird von vielen Wissenschaftlern als eines der ersten Signale des Feten an die Mutter angesehen. Die hCG-mRNA liegt schon im 8-Zellstadium vor^[212], wird dann vermehrt in der Blastozyste exprimiert^{[213][214]} und nach der Implantation in großen Mengen vom Trophoblasten, speziell vom Synzytiotrophoblasten gebildet^[215]. Nach der Implantation verdoppeln sich die hCG-Mengen alle 31 Stunden^[216]. Die höchsten hCG-Mengen werden zwischen der 10. und 11. SSW erreicht, anschließend ist ein Abfall der hCG-Menge zu verzeichnen, wobei geringe hCG-Level bis zur Geburt nachweisbar sind (Abb. 12)^{[217][218]}.

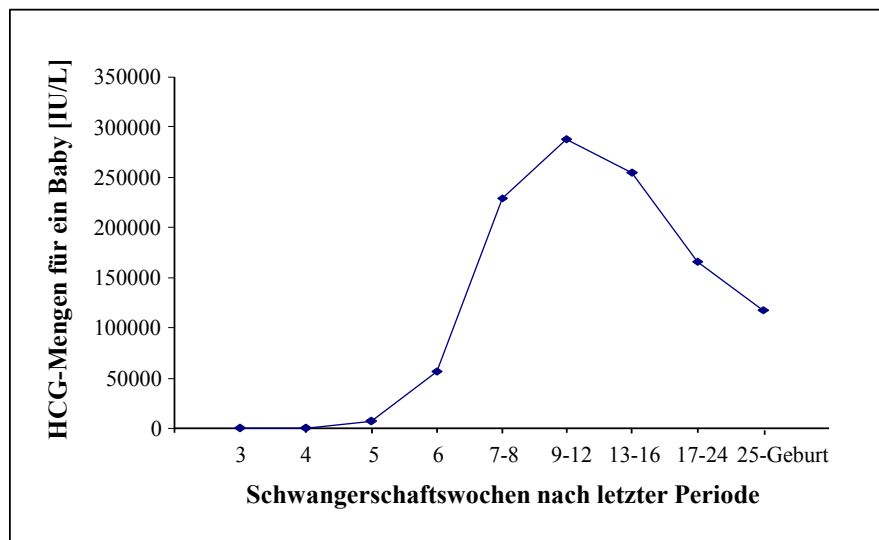


Abb. 12: HCG-Menge im Verlauf der Schwangerschaft. Die Menge an hCG steigt in den ersten Schwangerschaftswochen dramatisch an, hat ihren Höhepunkt zwischen der 10. – 11. SSW und fällt ab der 12. SSW auf ein geringeres Level ab, welches bis zur Geburt erhalten bleibt.

Der hohe hCG-Spiegel im Blut in der frühen Schwangerschaft und die Ausscheidung des hCG über den Urin werden schon seit Jahrzehnten zum Nachweis einer bestehenden Schwangerschaft eingesetzt^[219]. Darüber hinaus konnte die Expression von hCG auch in verschiedenen Trophoblasterkrankungen und Tumoren nachgewiesen werden, was hCG zu einem wertvollen Kandidaten für die Tumorerkennung macht^[33]. Die Biosynthese von hCG wird durch GnRH, durch den Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), Glukokortikosteroide sowie durch verschiedene Interleukine wie IL-1 oder TNF- α stimuliert^{[220][221][222][223]}. Im Gegensatz dazu unterdrückt Progesteron die hCG-Biosynthese^[224]. HCG vermittelt seine meisten Funktionen über die spezifische Bindung an den LH/CG-Rezeptor. Dieser besteht aus einer großen Ektodomäne, aus sieben Transmembrandomänen und einem intrazellulären Segment, welches an ein G-Protein gebunden ist. Nach Rezeptorbindung wird vorwiegend der zyklische Adenosinmonophosphat/Proteinkinase A (cAMP/PKA-) -Signalweg aktiviert^[225]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass einige Funktionen des hCG über den Mannoserezeptor (CD206) vermittelt werden^[226]. Der LH/CG-Rezeptor kommt auf luminalen und glandulären Epithelzellen vor, konnte aber auch auf stromalen, myometrialen und vaskulären glatten Muskelzellen nachgewiesen werden^[227].

2.8.2 Implantatorische und angiogenetische Funktionen des hCG

Die Hauptfunktion des hCG besteht in der Aufrechterhaltung des Gelbkörpers nach einer erfolgten Befruchtung der Eizelle. HCG verhindert somit die Luteolyse und stimuliert die Produktion von Progesteron bis zur 7. SSW, bis die Plazenta nach der luteo-plazentalen Verschiebung diese Funktion übernimmt^[228]. Darüber hinaus konnten dem hCG verschiedene schwangerschaftsfördernde und –erhaltende Funktionen zugeschrieben werden. So konnte gezeigt werden, dass das vom Embryo produzierte hCG die Dezidualisierung durch Hemmung des intrauterinen Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors (IGF)-bindenden Proteins-1 verlangsamt und somit das Implantationszeitfenster verlängert. Des Weiteren stimuliert hCG die Expression der MMP-9 und hemmt deren Inhibitoren (TIMP-1, -2, -3), was den Gewebeumbau begünstigt und die Tiefe der Implantation reguliert^[229]. Wichtige Faktoren für die Implantation wie LIF und der Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (M-CSF) werden in ihrer Expression ebenfalls durch hCG positiv reguliert (Abb. 13). Weitere Funktionen des hCG, die sich direkt auf die Proliferation und Kontraktilität der glatten Muskulatur im Endometrium auswirken, tragen erheblich zur erfolgreichen Implantation der Blastozyste bei^{[230][231][232]}. Das weibliche Reproduktionssystem unterliegt während des Menstrualzyklus, der Follikulogenese, der Ovulation, der Gelbkörperbildung und im Besonderen während der Plazentabildung einer ständigen Gefäßneubildung^[233]. Hierbei ist der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) ein wichtiger Regulator für das Wachstum der Gefäße. Durch Induktion von VEGF und durch Erhöhung der endometrialen Gefäßbildung trägt hCG direkt zur Ausbildung des plazentalen Gefäßbettes bei und gewährleistet die Versorgung des Feten (Abb. 13)^{[234][235]}. Die schwangerschaftsfördernden Funktionen des hCG macht man sich bereits in der Klinik zu Nutze, indem man Patientinnen, die eine *in vitro*-Fertilization (IVF) vornehmen in der Lutealphase mit hCG behandelt. Diese Behandlung hat in mehreren Studien zu erhöhten Schwangerschaftsraten im Vergleich zu Placebo-behandelten Kontrollen geführt^{[236][237][238]}. Der genaue Mechanismus, der dieser schwangerschaftsfördernden Wirkung des hCG zu Grunde liegt, ist jedoch noch nicht geklärt.

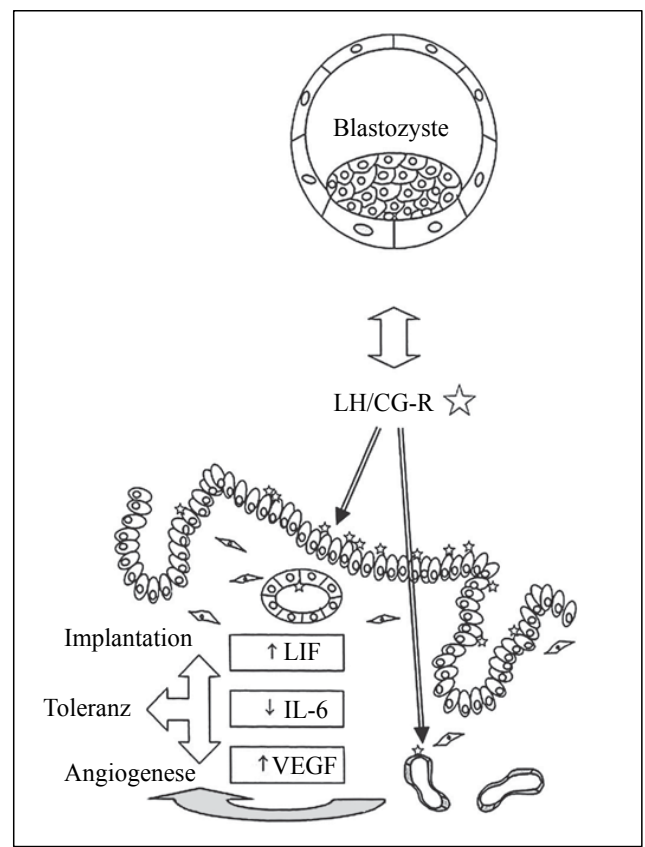


Abb. 13: Der Effekt des Embryos auf die Implantation, mütterliche Immuntoleranz und Angiogenese. HCG erhöht durch Bindung an seinen endometrialen LH/CG-Rezeptor die epitheliale Produktion von LIF und VEGF und vermindert die epitheliale Produktion von IL-6. Durch Bindung an seinen endothelialen LH/CG-Rezeptor stimuliert hCG die Angiogenese. Abbildung entnommen und modifiziert aus Literaturangabe^[239].

2.8.3 Immunregulatorische Funktionen des hCG

Neben den entscheidenden Funktionen, die die Implantation und Angiogenese betreffen, wurden in den letzten Jahren auch immunregulatorische Funktionen des hCG beschrieben. So konnten Khan und Kollegen zeigen, dass die Applikation von hCG in ein Mausmodell für autoimmunbedingten Diabetes, das Auftreten der Erkrankung verhindern konnte. Die Forscher erklärten die immunsuppressive Wirkung des hCG mit einer Inhibierung von Th1-Antworten und mit einer Erhöhung der Anzahl an T_{reg}-Zellen^[240]. Weitere Publikationen bestätigten die inhibitorische Wirkung des hCG auf T- und B-Lymphozyten^[241] durch Induktion von Suppressor-T-Zellen^{[242][243][244][245][246]}. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass hCG die Expression des Fas-Liganden im menschlichen Endometrium erhöht, was zu einer gesteigerten Apoptose von T-Zellen und Endometriumzellen beiträgt und somit die Inva-

sion des Trophoblasten erleichtert^[247]. In diesem Zusammenhang unterstützt hCG nachweislich auch die Funktion von Makrophagen, die zum Abtransport der apoptotischen Zellen beitragen und somit eine Entzündung vermeiden^[248]. Kane und Kollegen konnten außerdem einen Einfluss des hCG auf die Proliferation von uNK durch Bindung an den Mannoserezeptor zeigen^[226]. Letztendlich konnte auch nachgewiesen werden, dass hCG die Expression der immunsupprimierenden Moleküle IDO und IL-10 in aktivierten DZ induzieren kann, was im Weiteren die Aktivität von T-Zellen hemmt^[249]. Obwohl gezeigt werden konnte, dass die den T_{reg}-Zellen ähnlichen Suppressor-T-Zellen den LH/CG-Rezeptor exprimieren^[250] und die Gabe von hCG die Anzahl an T_{reg}-Zellen bei autoimmunbedingten Diabetes erhöhen kann^[240], ist die genaue Wirkung des hCG auf T_{reg}-Zellen noch unbekannt und wird im Rahmen dieser Arbeit in der Schwangerschaft untersucht.

2.9 Zielstellung

Seit Jahrzehnten versuchen Wissenschaftler die grundlegenden Mechanismen, die zur Toleranz des Feten durch das mütterliche Immunsystem führen, aufzuklären. CD4⁺CD25⁺ T_{reg}-Zellen expandieren während einer normal verlaufenden Schwangerschaft und leisten einen entscheidenden Beitrag zum Aufbau und zur Aufrechterhaltung dieser Toleranz gegenüber dem Fetus. Trotz intensiver Forschung sind jedoch die genauen Faktoren und Abläufe, die der Expansion und Funktion der T_{reg}-Zellen in der Schwangerschaft zu Grunde liegen, bis heute weitgehend ungeklärt. Daher werden im Rahmen dieser Doktorarbeit Faktoren und Mechanismen untersucht, die die Generierung, Expansion, Migration und Funktion der T_{reg}-Zellen in der Schwangerschaft beim Menschen und der Maus beeinflussen. Im Besonderen wird einerseits der Einfluss von väterlichen Antigenen auf die Expansion der T_{reg}-Zellen analysiert und andererseits, inwieweit das Schwangerschaftshormon hCG zur Migration der T_{reg}-Zellen zur fetal-mütterlichen Grenzfläche sowie zur Generierung und Funktion der T_{reg}-Zellen beiträgt. In drei Versuchskomplexen werden folgende Fragestellungen bearbeitet:

Versuchskomplex I: Untersuchungen zur Expansion der T_{reg}-Zellen vor der Schwangerschaft

- (1) Können Hormon-bedingte Veränderungen in der Anzahl an T_{reg}-Zellen im Estruszyklus der Maus bereits vor Eintreten einer Schwangerschaft beobachtet werden?

Versuchskomplex II: Untersuchungen zum Einfluss von väterlichen Antigenen des Ejakulats auf die Expansion der T_{reg}-Zellen

- (1) Sind väterliche Antigene im Ejakulat verantwortlich für die Expansion der T_{reg}-Zellen *in vivo*?
- (2) Können Unterschiede in der Expansion von T_{reg}-Zellen bezüglich der Anwesenheit von Spermien oder Samenblasenflüssigkeit *in vivo* beobachtet werden?
- (3) Treten Unterschiede in der Expansion von T_{reg}-Zellen nach Gabe von syngener oder allogener Samenblasenflüssigkeit *in vitro* auf?
- (4) Bewirkt TGF- β als ein Hauptbestandteil der Samenblasenflüssigkeit die Expansion der T_{reg}-Zellen?

Versuchskomplex IIIa: Untersuchungen zum Einfluss des hCG auf die Migration der T_{reg}-Zellen in der menschlichen Schwangerschaft

- (1) Ist die Menge an hCG sowie die Anzahl und Funktion von T_{reg}-Zellen in Patientinnen mit Schwangerschaftskomplikationen gegenüber normal schwangeren Frauen verändert?
- (2) Exprimieren T_{reg}-Zellen den LH/CG-Rezeptor auf ihrer Oberfläche?
- (3) Bewirkt hCG eine Migration von menschlichen T_{reg}-Zellen zu Trophoblasten *in vitro*?
- (4) Trägt hCG zur *ex vivo*-Generierung von T_{reg}-Zellen aus naiven T-Zellen bei?

Versuchskomplex IIIb: Untersuchungen zum Einfluss des hCG auf die Expansion, Generierung und Funktion der T_{reg}-Zellen in der Mausschwangerschaft

- (1) Kann die Applikation von hCG die Abortrate im Mausabortmodell senken?
- (2) Bewirkt die Applikation von hCG eine Expansion von T_{reg}-Zellen im Mausabortmodell?
- (3) Moduliert die Applikation von hCG den Phänotyp von DZ und bewirkt sie auf diesem Weg eine Erhöhung der Anzahl an T_{reg}-Zellen?
- (4) Steigert die Applikation von hCG die schützende Funktion der T_{reg}-Zellen?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Allgemeine Laborausstattung

Blutgaskapillaren (heparinisiert)	Kabe Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland
Digitalkamera Canon IXUS 80 IS	Bauer Electronics, Magdeburg, Deutschland
Einmal-Dentalkanülen (27G)	Braun, Melsungen, Deutschland
Eisbad	Neolab Migge Laborbedarf, Heidelberg, Deutschland
Eismaschine ZBE 70-35	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen, Deutschland
Glasmaterialien	Neolab Migge Laborbedarf, Heidelberg, Deutschland
Kapillarpipetten	Servoprax [®] , Wesel, Deutschland
Kühlschrank Liebherr FKEX 3600	Rexel Deutschland, Hannover, Deutschland
Kühlschrank Liebherr KTP 1810-20	Unielektro, Eschborn, Deutschland
Laboklav 80-V	SHP Steriltechnik AG, Magdeburg, Deutschland
Magnetrührer RH Basic 2 IKAM	Windaus-Labortechnik, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland
Mikrotestplatte	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mikrowelle	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Minishaker MS 3 Basic	Laborfachhandel Gaudig GbR, Sülzetal, Deutschland
Mini Spin	Fisher Scientific, Nidderau, Deutschland
Parafilm M	Neolab Migge Laborbedarf, Heidelberg, Deutschland
Pasteurpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
pH-Meter	Neolab Migge Laborbedarf, Heidelberg, Deutschland
Pipetten	Eppendorf Vertrieb, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Pipettenspitzen (Typ A-C)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Präparationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Präzisionswaage LA 620	Sartorius, Berlin, Deutschland

Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf Vertrieb, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Reinigungs- und Desinfektionsautomat	Omnilab-Laborzentrum, Bremen, Deutschland
Skalpell	Feather®, Osaka, Japan
Trockenschrank	Novodirect Labortechnik, Kehl, Deutschland
Ultra-Tiefkühlschrank MDF-U53V	Laborfachhandel Gaudig GbR, Sülzetal, Deutschland
Zentrifuge 5810R	Eppendorf Vertrieb, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Zentrifuge 5417R	Eppendorf Vertrieb, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Zentrifuge Biofuge	Thermo Fisher, Dreieich, Deutschland

3.1.2 Computerprogramme

AxioVision Rel. 4.6	Zeiss Microimaging, Göttingen, Deutschland
Cell Quest Pro 4.bf4b	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Gen 5 TM Data Analysis Software	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland
GraphPad Prism 5.0	Statcon, Witzenhausen, Deutschland
iQ5 Software	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Microsoft Excel 2003	Microsoft Deutschland, Berlin, Deutschland
Microsoft PowerPoint 2003	Microsoft Deutschland, Berlin, Deutschland
Microsoft Word 2003	Microsoft Deutschland, Berlin, Deutschland
SPSS Statistics 17.0	SPSS Inc., IBM, Chicago, USA

3.1.3 Geräte und Material für Zellkultur

CO ₂ -Inkubator HERACELL	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
CO ₂ -Inkubator NU-5500 E	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Descosept	Dr. Schumacher, Melsungen, Deutschland
Kryo-Einfriergerät	Fisher Scientific, Nidderau, Deutschland
Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
KryoSystem 4000	German Cryo Jutta Ohst, Jüchen, Deutschland
Mikroskop Axiovert 40C	Zeiss Microimaging, Göttingen, Deutschland

Mikroskop Axio Observer A1	Zeiss Microimaging, Göttingen, Deutschland
Mobiler UV-C Strahler	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Neubauer Zählkammer	VWR, Darmstadt, Deutschland
Probenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Puradisc Syringe Filter (0,2 µm)	Whatman, Dassel, Deutschland
Schüttelwasserbad SWB 25	Windaus-Labortechnik, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sicherheitswerkbank NU-437-400E	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Sterile Einwegspritzen (30 ml)	Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Deutschland
Zellkultur-Einsätze	BD Falcon, Erembodegem, Belgien
Zellkulturflaschen (25 cm ³ , 75 cm ³)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen (Collagen IV, 25 cm ³)	BD, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturplatten (6-, 24-, 96-Loch)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellsiebe (40 µm, 70 µm, 100µm)	BD Falcon, Erembodegem, Belgien

3.1.4 Geräte und Material für magnetische Zellsortierung

MACS TM Ständer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
OctoMACS TM Separationseinheit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
QuadroMACS TM Separationseinheit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Säulen (MS, LD)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

3.1.5 Geräte und Material für molekularbiologische Methoden

ABI Prism 7700 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Dispergierer	Windaus-Labortechnik, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland
Filterspitzen RNase-/ DNase-frei (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
HP 845x UV-Visible System Software	Hewlett Packard, Palo Alto, USA

HP Spektrophotometer	Hewlett Packard, Palo Alto, USA
iQ5 Real-time PCR System	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Rotilab-PCR Reaktionsgefäße	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Safe Lock Röhrchen (0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml)	Eppendorf Vertrieb, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Synergy HAT	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland
Thermocycler	Fisher Scientific, Nidderau, Deutschland
Thermo-Fast 96 PCR-Platten	ABgene, Epsom, England
Ultra Clear Cap Strips	ABgene, Epsom, England
Ultra Turrax T25 Homogenisator	Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
UV-Star Microplatte (96-Loch)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland

3.1.6 Geräte und Material für Durchflusszytometrie

BD FACS Calibur TM 4CA	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACS Flow	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACS (Rinse, Clean)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Omnifix [®] - 1 ml Spritzen	Braun, Melsungen, Deutschland
Polystyren-Rundbodenröhrchen (5 ml)	BD Falcon, Erembodegem, Belgien

3.1.7 Geräte und Material für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Deckgläser	Paul-Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Einzelkochtafel	Rommelsbacher ElektroHausgeräte, Dinkelsbühl, Deutschland
Fettstift (Dako-Pen)	Dako, Glostrup, Dänemark
Objektträger	R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland
Paraffin-Ausgießstation	Thermo Fisher, Dreieich, Deutschland
Paraffin-Streckbad 1052	Omnilab-Laborzentrum, Bremen, Deutschland
Rotationsmikrotom HM 355 S	Thermo Fisher, Dreieich, Deutschland
Schnellkochtopf Sicomatic [®]	Silit, Riedlingen, Deutschland

3.1.8 Chemikalien und Lösungen

3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (AEC)	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Accustain® Eosin-Lösungen	Sigma, Steinheim, Deutschland
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Fluka Biochemika, Steinheim, Deutschland
Aquatex Einbettmedium	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Sigma, Steinheim, Deutschland
Di-Methyl-Sulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
1,4-Dithio-DL-Threitol (DTT)	Fluka Biochemika, St. Louis, USA
Ethanol 100 Vol-%	Otto Fischer, München, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Ficoll-Paque™ Research Grade	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Fluorescein	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Hämatoxylin (nach Meyer)	Fluka Biochemika, Steinheim, Deutschland
Heparin-Natrium	Zentralapotheke (UFK), Magdeburg, Deutschland
Hepes	Biochrom, Berlin, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Ketaminhydrochlorid	Pharma Partner, Hamburg, Deutschland
Lympholyte M®	Linaris, Bettingen am Main, Deutschland
Lymphozyten Separationsmedium (LSM)	MP Biochemicals, Illkirch, Frankreich
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland

M-MLV RT 5x Reaktionspuffer	Promega, Mannheim, Deutschland
Natriumazid (NaN_3)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat	Sigma, Steinheim, Deutschland
Paraffin (Paraplast Plus)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Roti [®] -Histokitt	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Saccharose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure (H_2SO_4)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Trisbase	Sigma, Steinheim, Deutschland
Trishydrochlorid	Sigma, Steinheim, Deutschland
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau-Lösung	Sigma, Steinheim, Deutschland
Trypsin (für Trophoblastenisolierung)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Vectashield [®] Einbettmedium für Fluoreszenz mit DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Wasserstoffperoxid (39%)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylazinhydrochlorid (Rompun)	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Xylol	Roth, Karlsruhe, Deutschland

3.1.9 Medien und Pufferlösungen

Medien

DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>) + Glucose, + L-Glutamine, + Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
HBSS (<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
McCoy's 5A Medium	Biochrom, Berlin, Deutschland

Medium 199 Earles und Hepes	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
MEM (<i>Minimum Essential Medium</i>)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
OPTI-MEM 1	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
RPMI (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>) 1640 + L-Glutamine	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Medium für HaCat- und JEG-3-Zellen

DMEM mit	10 % FKS
	10 mM Hepes
	0,1 mM MEM
	1 mM Natriumpyruvat
	100 ng/ml Penicillin/Streptomycin (P/S)

Medium für HCT116-Zellen

McCoy's 5A Medium mit	10 % FKS
-----------------------	----------

Medium für Primäre Trophoblasten

Medium 199 mit	10 % FKS
	50 mg/ml Normocin

Verdaulösung für Trophoblastenisolierung

Verdaulösung	1 mM MgSO ₄
	0,125 % Trypsin
	10 U/ml DNase I
	in 95 ml PBS

Verdaulösung für Milzzellisolierung

Verdaulösung	2 mg/ml Collagenase Typ IV
	150 mM NaCl
	5 mM KCl

1 mM MgCl_2
1,8 mM CaCl_2
in 10 mM Hepes-NaOH pH 7,4

Verdaulösung für Deziduazellisolierung

Verdaulösung 200 U/ml Hyaluronidase
 1 mg/ml Collagenase Typ IV
 0,2 mg/ml DNase I
 1 mg/ml BSA
 in 1x HBSS-Medium

Einfriermedium für Zellen

Einfriermedium 10 % FKS
 90 % DMSO

Pufferlösung für Immunhistochemie

Citrat-Puffer 1,8 mM Zitronensäure
 8,2 mM Natriumcitrat

EDTA-Puffer 1,21 g Trisbase
 0,37 g EDTA
 in destilliertem Wasser, pH 9,0

Fixierungslösung 4 % Paraformaldehyd (PFA)
 6,846 g Saccharose
 in 200 ml PBS, pH 7,4

PBS (10x) 80 g NaCl
 21,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
 2 g KH_2PO_4
 2 g KCl
 mit destilliertem Wasser auf 1 L auffüllen

Tris-gepufferte Salzlösung (TBS (10x)) 200 mM Trisbase
 80 g/L NaCl

10 % Natriumdodecylsulfat (SDS)

in destilliertem Wasser, pH 7,6

Pufferlösung für Durchflusszytometrie

FACS-Puffer

1% BSA

0,1 % NaN₃

in PBS

Lysis-Puffer

1,5 M NH₄Cl

10 mM KHCO₃

100 mM EDTA

in destilliertem Wasser

Pufferlösung für magnetische Zellsortierung

MACSTM-Puffer

0,5 % BSA

2 mM EDTA

in PBS, pH 7,4

3.1.10 Enzyme, Proteine, Nukleinsäuren und andere biologisch aktive Substanzen

Collagenase Typ IV

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Desoxy-Nukleotidtriphosphate (dNTPs)

Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland

DNAse (für reverse Transkription)

Stratagene, Amsterdam, Niederlande

DNase I (für Verdau)

Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Fötales Kälberserum (FKS)

Biochrom, Berlin, Deutschland

hCG siRNA

Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

hCG

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Humanes rekombinantes IL-2

R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

Humanes rekombinantes TGF- β

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

Hyaluronidase

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Mitomycin C

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

M-MLV Reverse Transkriptase

Promega, Mannheim, Deutschland

Oligo-Desoxy-Thymidin-Nukleotide (odTs)	Promega, Mannheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Steinheim, Deutschland
RNAse-Inhibitor	Promega, Mannheim, Deutschland
siPort™ NeoFX™ Transfection Agent	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
SYBR® Green PCR Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
TaqMan-Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

3.1.11 Antikörper

Zellkultur

Ratte anti-TGF- β (1D11)	bereit gestellt von: Hideo Yagita, Department der Immunologie, Jutendo Universität, Tokio, Japan		
Aufgereinigter NA/LE Maus anti-Human CD3 (Klon: HIT3a)	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland		
Aufgereinigter NA/LE Maus anti-Human CD28 (Klon: CD28.2)	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland		

Durchflusszytometrie

Alexa Fluor®488 Maus anti-Human Foxp3 (Klon: 259D/C7)	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Alexa Fluor®647 Maus anti-Maus/-Ratte Foxp3 (Klon: FJK-16s)	eBiosciences, Frankfurt, Deutschland
Allophycocyanin Maus anti-Human CD25 (Klon: M-A251)	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Allophycocyanin Hamster anti-Maus CD11c (Klon: HL3)	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Fluoresceinisothiocyanat konjugierter anti-Kaninchen Immunglobulin-spezifischer polyklonaler AK	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Fluoresceinisothiocyanat Hamster anti-Maus	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland

CD80 (Klon: 16-10A1)

Fluoresceinisothiocyanat Ratte anti-Maus BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland

CD4 (Klon: RM4-4)

Polyklonaler AK anti-Human Luteinisierendes Acris, Hiddenhausen, Deutschland

Hormon/Choriongonadotropin Rezeptor

Phycoerythrin anti-Human CD152 (CTLA-4) BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
(Klon: BNI3)

Phycoerythrin anti-Maus/-Ratte Foxp3 (Klon: eBiosciences, Frankfurt, Deutschland
FJK-16s)

Phycoerythrin Ratte anti-Maus I-A/I-E (Klon: BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
M5/114.15.2)

Immunhistochemie

Pferd anti-Maus IgG (H+L) Vector Laboratories, CA, USA

Maus anti-Human Zytokeratin AE1/AE3 AK Dako, Glostrup, Dänemark

Polyklonaler Ziege anti-Kaninchen Ig Dako, Glostrup, Dänemark

Polyklonaler Kaninchen anti-Human CG Dako, Glostrup, Dänemark

Immunfluoreszenz

Fluoresceinisothiocyanat konjugierter Ziege BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
anti-Kaninchen Immunglobulin-spezifischer
polyklonaler AK

Polyklonaler AK anti-Human Luteinisierendes Acris, Hiddenhausen, Deutschland
Hormon/Choriongonadotropin Rezeptor

3.1.12 Primer

	Primer (5' -> 3')	Sonde (5' -> 3')
hCG	Fw: CTGTTGCTGCTGCTGAGCAT	CGCTTCCAGGACTCCAAGCG
(Mensch)	Rev: ACATCGCGGTAGTTGCACAC	
Foxp3	Fw: TGGCAAACGGAGTCTGCAA	AGCCGGGAGAGTTTCTCAAGCACT
(Mensch)	Rev: TCTCATCCAAGAGGTGATCTGCTT	GC

Nrp-1	Fw: GCCTGCTTTCTTCTCTTGGTTTCA	_____
(Mensch)	Rev: GCTCTGGGCACTGGGCTACA	
IL-10	Fw: CAAGTTGTCCAGCTGATCCTTCAT	AAAGAAAGTCTTCACTCTGCTGAA
(Mensch)	Rev: GGCAACCTGCCTAACATGCTT	GGCATCTCG
TGF- β	Fw: CCCTGCCCCCTACATTGGAG	CACGCAGTACAGCAAGGTCCTGGC
(Mensch)	Rev: CCGGGTTATGCTGGTTGTACA	C
β -Aktin	Fw: GATCATTGCTCCTCCTGAGC	CTCGCTGTCCACCTTCCAGCAGAT
(Mensch)	Rev: ACTCCTGCTTGCTGATCCAC	

3.1.13 Expressionsvektoren

pcDNA3.1 (+) Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

3.1.14 Kits

β-hCG ELISA			DRG Instruments, Marburg, Deutschland
Biorad Proteinassay			Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
CD4 ⁺ T-Zell-Isolations-Kit			Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Regulatorisches Isolations-Kit (Maus)	T-Zell-		Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Regulatorisches Isolations-Kit (Mensch)	T-Zell-		Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD11c MicroBeads			Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Foxp3 Färbe Set			eBiosciences, Frankfurt, Deutschland
Progesteron LIA Kit			Diagnostics Biochem Canada Inc., Kanada
TMB Substrat Reagenz Set			Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Vectastain ABC Kit			Vector Laboratories, Burlingame, USA
Vybrant CFDA-SE Cell Tracer Kit			Molecular Probes, Leiden, Niederlande

3.1.15 Primäre Zellen und Zelllinien

HaCat (Keratinozytzelllinie)	freundlicherweise bereit gestellt von: Martina Seifert, Institut für Immunologie, Berlin, Deutschland
HCT116 (Darmkrebszellen)	DSMZ (ACC581), Braunschweig, Deutschland

JEG-3 (Choriokarzinomzellen)	freundlicherweise bereit gestellt von: PD Dr. Udo Markert, Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Jena, Deutschland
Primäre Trophoblasten	Isolation aus Plazentagewebe (Schwangerschaftsabbruch)

3.1.16 Tierstämme und Tierhaltung

BALB/c	Harlan Winkelmann, Borcheln oder Charles River, Sulzfeld, Deutschland
BALB/c (vasektomiert)	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
BALB/c (ohne Samenblasen)	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
CBA/J	Charles River, L'Arbresle Cedex, Frankreich
DBA/2J	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
C57BL/6	Wildtypmäuse aus eigener Kolonie (<i>Foxp3^{gfp}</i>), ursprünglich generiert von Dr. Fontenot ^[251] (Department of Immunology, University of Washington, Seattle, USA), nach Transferabkommen (MTA-Material Transfer Agreement) freundlicherweise bereit gestellt von Prof. Rudensky (University of Washington, Seattle, USA)
BALB/c	Wildtypmäuse aus eigener Kolonie (<i>Hmox-1^{+/+}</i>), ursprünglich generiert von Dr. Yet ^[92] (Harvard Medical School, Boston, USA), nach Transferabkommen (MTA-Material Transfer Agreement) freundlicherweise bereit gestellt von Miguel Soares (Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal)

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Tierexperimente wurden durch die Tierschutzbehörden in Berlin (LaGeSO, G 070/03) und Halle (LVwA, Referat Verbraucherschutz und Veterinärangelegenheiten, AZ: A2-203.h-42502-2-868) genehmigt. Die Tiere waren in der experimentellen Einrichtung des Biomedizinischen Forschungszentrums der Charité, Berlin (Campus Virchow Klinikum) und in der Tierhaltung der experimentellen Gynäkologie und Geburtshilfe in Magdeburg artgerecht untergebracht. Die Tiere waren einem wechselnden 12-stündigen Licht-/Dunkelheitsrhythmus ausge-

setzt. Die Tierkäfige wurden einmal wöchentlich gereinigt. Wasser und Futter standen den Mäusen nach Bedarf (*ad libitum*) zur Verfügung.

3.2 Methoden

3.2.1 Versuchsteil I: Untersuchungen zur Expansion der T_{reg}-Zellen vor der Schwangerschaft

3.2.1.1 Gewinnung von Vaginalflüssigkeit zur Bestimmung des Zyklusstadiums

Zur Gewinnung von Vaginalflüssigkeit wurden bei jungfräulichen Mäuseweibchen einmal täglich zur gleichen Zeit Vaginalspülungen mit 50 µl sterilem PBS vorgenommen. Die erhaltene Suspension aus Zellen und toten Schleimhautresten wurde bei 7000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 10 µl PBS resuspendiert und auf einem Objektträger ausgestrichen. Das Zyklusstadium wurde an Hand seiner spezifischen Charakteristika unter dem Durchlichtmikroskop bei einer Vergrößerung von X100 bestimmt.

3.2.1.2 Bestimmung der Anzahl an T_{reg}-Zellen während des Estruszyklus in der Maus

Jungfräuliche CBA/J-Weibchen wurden in allen vier Stadien des Estruszyklus (Diestrus, Proestrus, Estrus und Metestrus) getötet. Lymphozyten wurden wie unter 3.2.4.5/3.2.4.6 beschrieben aus den lokalen Lymphknoten und dem Uterus isoliert. Zur Gewinnung von Lymphozyten aus dem Vaginalschleim wurde den Mäuseweibchen Vaginalflüssigkeit in allen vier Zyklusstadien entnommen (siehe 3.2.1.1). Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet in 10 ml FKS-haltigem RPMI-Medium resuspendiert. Anschließend erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 1200 rpm für 10 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml FKS-haltigem RPMI-Medium aufgenommen. Die Lymphozytensuspensionen wurden wie unter 3.2.4.16.1 erläutert gefärbt und die Anzahl an CD4⁺Foxp3⁺ Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

3.2.2 Versuchsteil II: Untersuchungen zur Expansion der T_{reg}-Zellen während der frühen Schwangerschaft

3.2.2.1 Verpaarung der Mäuse

Weibliche, zwei Monate alte Mäuse, wurden mit zwei bis vier Monate alten Mäusemännchen verschiedener Mausstämme verpaart. Die Mäuse wurden zwei Mal täglich (morgens und abends) auf das Auftreten eines Vaginalpfropfs kontrolliert. Das Auftreten des Vaginalpfropfs kennzeichnet Tag

Null der Schwangerschaft. Entsprechend des experimentellen Ansatzes wurden die Mäuseweibchen an verschiedenen Schwangerschaftstagen getötet und Gewebeproben entnommen.

3.2.2.2 Bestimmung des Einflusses von Bestandteilen des Ejakulats auf die Expansion von T_{reg} -Zellen

CBA/J-Weibchen wurden entweder mit intakten BALB/c-, vasktomierten BALB/c- (ohne Spermien) oder samenblasendefizienten BALB/c-Männchen (ohne Samenblasenflüssigkeit) verpaart (Abb. 14). Auf Grund des fehlenden Vaginalpfropfens bei der Verpaarung mit samenblasendefizienten BALB/c-Männchen wurde der erste Schwangerschaftstag (Tag 0) durch das Auftreten von Spermien festgelegt. Hierfür wurde zur Gewinnung von Vaginalflüssigkeit bei den Mäuseweibchen täglich eine Vaginalspülung vorgenommen (siehe 3.2.1.1). Die Präsenz der Spermien in der Vaginalflüssigkeit wurde mittels Durchlichtmikroskopie nachgewiesen. Die Schwangerschaft wurde zudem durch den Anstieg an Progesteron verifiziert (siehe 3.2.2.7.1). Die Mäuseweibchen wurden an den Schwangerschaftstagen 0,5; 2 oder 5 getötet. Thymus, Milz, paraaortische Lymphknoten und Blut wurden entnommen. Lymphozyten wurden aus allen Organen isoliert und wie unter 3.2.4.16.1 erläutert gefärbt. Die Anzahl an $Foxp3^+$ -Zellen und $CD4^+Foxp3^+$ -Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

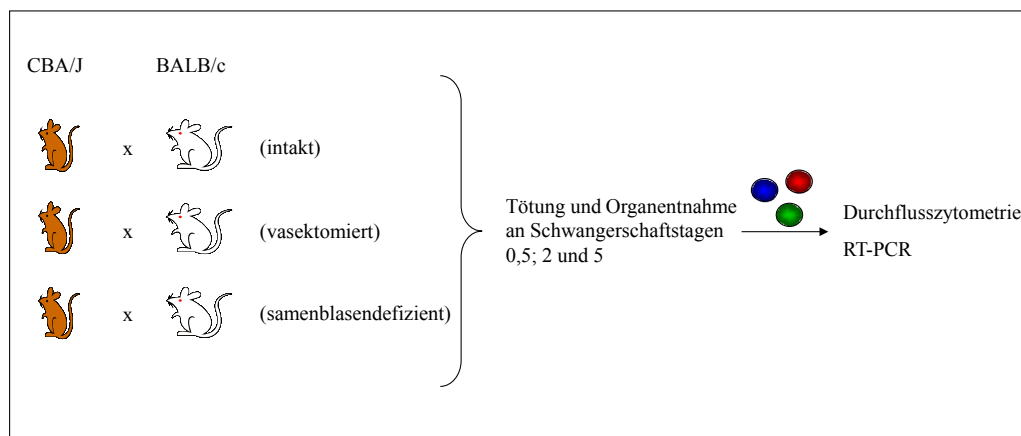


Abb. 14: Schematische Darstellung der Mausverpaarungen zur Untersuchung des Einflusses des Ejakulats auf die Expansion der T_{reg} -Zellen. CBA/J-Weibchen wurden mit intakten, vasektomierten oder samenblasendefizienten BALB/c-Männchen verpaart. Die schwangeren Mäuseweibchen wurden an den Schwangerschaftstagen 0,5; 2 oder 5 getötet und die Anzahl an $Foxp3^+$ -Zellen und $CD4^+Foxp3^+$ -Zellen im Thymus, in der Milz, in den lokalen Lymphknoten und im Blut mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

3.2.2.3 Gewinnung von Samenblasenflüssigkeit

Zur Gewinnung von Samenblasenflüssigkeit (SBF) wurde der Abdominalbereich von BALB/c- oder C57BL/6-Männchen unter sterilen Bedingungen eröffnet (siehe 3.2.4.3). Die Samenblasen wurden entnommen, in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in diesem zerkleinert. Nach Zugabe von 400 µl sterilem PBS wurde die SBF bei 1000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Hierbei wurde die proteinhaltige SBF von Geweberesten getrennt. Der Überstand wurde in ein neues steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und ein weiteres Mal bei 9000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die darin enthaltene Menge an Protein bestimmt.

3.2.2.4 Proteinkonzentrationsbestimmung in der Samenblasenflüssigkeit

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in der SBF wurde mit dem BioRad Protein Assay durchgeführt. Für die Standardreihe wurde eine BSA-Stocklösung in einer Konzentration von 1 mg/ml hergestellt. Ausgehend von dieser Stocklösung wurden folgende Verdünnungen angefertigt: 0,5; 0,25; 0,1; 0,05; 0,025 und 0,01 mg/ml. Die BioRad-Lösung wurde 1/5 vorverdünnt. Jeweils 20 µl der Probe und der Standardverdünnungen wurden mit 400 µl vorverdünnter BioRad-Lösung versetzt. Je 210 µl jedes Gemisches wurden dann auf eine 96-Lochplatte als Doppelbestimmung gegeben und im Mikrotiterplattenleser bei 595 nm vermessen. Die Berechnung der Proteinkonzentration der Probe ergab sich aus folgender Gleichung:

$$\text{Konzentration der Probe [mg/ml]} = \frac{\text{Optische Dichte der Probe [595 nm]}}{\text{Anstieg der Eichgerade}}$$

Die Proteinkonzentration in der SBF betrug zwischen 6 – 8 mg/ml.

3.2.2.5 *In vitro*-Behandlung von T_{reg}-Zellen und T-Effektorzellen mit Samenblasenflüssigkeit oder rekombinanten Molekülen

Nach Isolierung von T_{reg}-Zellen und CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus einem Gemisch von Milz und Thymus (siehe 3.2.4.7) wurden beide Zellpopulationen mit CFDA-SE gefärbt (siehe 3.2.4.11). Nach der Färbung wurden die Zellen in FKS- und P/S-haltigem RPMI-Medium aufgenommen und die SBF in zwei Konzentrationen (140 ng/ml Protein bzw. 70 ng/ml Protein) zugesetzt. Als Kontrolle wurden die Zellen in Kulturmedium ohne SBF kultiviert. Darüber hinaus wurden die Zellen unter Zugabe von rekombinantem TGF-β1 (10 ng/ml oder 20 ng/ml) kultiviert. Entsprechende Ansätze wurden für 0, 24

und 48 Stunden als Doppelbestimmungen angesetzt. Zur Stimulation der Proliferation wurde dem Medium IL-2 in einer Konzentration von 10 ng/ml zugesetzt. Die Proliferation der T_{reg}-Zellen und CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

3.2.2.6 Gewinnung von Blutplasma für die Bestimmung des Progesterongehaltes

Die Blutproben wurden bei 7000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Die Zentrifugation bewirkte ein Absinken aller zellulären Bestandteile, wobei im oberen Bereich des Probengefäßes das Blutplasma als klarer Überstand verblieb. Das Blutplasma wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Probengefäß überführt. Die Proben wurden bis zur Progesteronbestimmung mittels Chemilumineszenz bei -80 °C gelagert.

3.2.2.7 Chemilumineszenz Immunoassay (CLIA)

Bei dieser Methode handelt es sich um ein kompetitives Immunoassay bei dem das Antigen (Progesteron) der Probe mit dem Enzym-markierten Antigen des Kits um eine begrenzte Anzahl an AK-Bindungsstellen auf der Mikrotiterplatte konkurriert. Die Menge an Enzym-markiertem Antigen wird dann mittels Chemilumineszenz nach Umsetzen des Substrates durch das Enzym gemessen. Der Messwert ist dabei invers proportional zu der unbekannten Antigenkonzentration der Probe. Das ergibt sich aus der Überlegung, dass je mehr Enzym-markiertes Antigen binden konnte, umso weniger unmarkiertes Antigen in der Probe enthalten war.

3.2.2.7.1 Progesteronbestimmung mittels Lumineszenz

Blutplasmaproben von CBA/J-Weibchen, welche mit samenblasendefizienten BALB/c-Männchen verpaart worden waren, wurden zur Absicherung einer bestehenden Schwangerschaft auf ihren Progesterongehalt untersucht. Nach Eintreten einer Schwangerschaft steigt die Progesteronkonzentration im Blutplasma an. Die Bestimmung des Progesterongehaltes wurde unter Verwendung des Progesteron LIA Kits vorgenommen. Nachdem die Plasmaproben auf Eis aufgetaut waren, wurden jeweils 25 µl der Proben, einer Positivkontrolle und der Kalibratoren (Standardkurve) in je ein Loch einer 96-Lochplatte gegeben. Alle Proben, Kontrollen und Kalibratoren wurden als Doppelbestimmungen ermittelt. In jedes Loch wurden 100 µl Meerrettich-Peroxidaselösung (1/100 vorverdünnt in Assaypuffer) mit einer Multikanalpipette gegeben. Es folgte eine Inkubation von 1 Stunde auf einem Schüttler (~200 rpm) bei RT. Nach der Inkubation wurde die 96-Lochplatte fünf Mal mit je 300 µl Waschpuffer (1/10 vorverdünnt in destilliertem Wasser) gewaschen, wobei der Waschpuffer durch Ausklopfen der

Platte auf saugfähigem Papier aus den Löchern entfernt wurde. Anschließend wurde die LIA Substratlösung hergestellt. Lösung A und Lösung B wurden zu gleichen Anteilen gemischt und 1/5 in Lösung C verdünnt. Je 100 µl der fertigen Substratlösung wurden in jedes Loch gegeben, die Platte 10 Sekunden lang leicht geschüttelt und dann 10 Minuten bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation sollte die Messung der Lumineszenz innerhalb von 20 Minuten erfolgen, da sonst eine deutliche Abnahme der Lumineszenz-Intensität zu verzeichnen war. Die Lumineszenz wurde mit Hilfe eines Chemilumineszenzgerätes ermittelt und die gemessenen Werte als relative Lumineszenzeinheiten (RLU) dargestellt. An Hand der ermittelten Werte für die Kalibratoren war es möglich eine Standardkurve zu erstellen, bei der die RLUs gegen die von den Kalibratoren bekannten Progesteronkonzentrationen aufgetragen wurden. Nach Erstellen einer Regressionsgeraden ($r^2 > 0,95$) konnten die Konzentrationen der Plasmaproben mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Konzentration der Probe [ng/ml]} = \frac{\text{RLU der Probe}}{\text{Anstieg der Eichgerade}}$$

3.2.3 Versuchsteil III: Einfluss des Schwangerschaftshormons Choriongonadotropin auf die Generierung, Migration und Funktion von T_{reg}-Zellen unter Verwendung von menschlichen Proben

3.2.3.1 Entnahme von Humanproben

Zur Quantifizierung von hCG und des Anteils an T_{reg}-Zellen in menschlichen Gewebeproben wurden uns freundlicherweise schockgefrorene und Paraffin-eingebettete Dezidua- und Plazentaprobe von Prof. Henry Alexander aus der Abteilung der Gynäkologie und Geburtshilfe der Universität Leipzig zur Verfügung gestellt. Die Gewebeproben stammten von normal schwangeren Frauen, die einen Schwangerschaftsabbruch aus persönlichen Gründen vorgenommen hatten oder von Patientinnen, die entweder unter Spontanabort oder einer extrauterinen Schwangerschaft litten (Tab.1). Für die Migrationsstudien erhielten wir Blutproben von normal schwangeren Frauen des ersten oder dritten Trimesters ihrer Schwangerschaft aus der Universitätsfrauenklinik Magdeburg. Darüber hinaus erhielten wir zur Isolierung von primären Trophoblastzellen plazentales Gewebe von normal schwangeren Frauen, welche einen Schwangerschaftsabbruch veranlasst hatten. Die Gewebeproben stammten ebenfalls aus der Universitätsfrauenklinik Magdeburg. Die Entnahme der menschlichen Proben wurde von den Ethikkommissionen der Universitäten in Magdeburg (Studie 28/08) und Leipzig (Studie 254/07) genehmigt.

Tab. 1: Anzahl und Charakteristika von normal schwangeren Frauen sowie Patientinnen mit Spontanabort oder extrauteriner Schwangerschaft. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichungen dargestellt.

<i>Blutproben</i>	<i>Alter</i>	<i>Schwangerschaftswoche</i>
Normal schwangere Frauen (n=8, erstes/zweites Trimester)	27.25 \pm 6.08	16.25 \pm 2.76
Normal schwangere Frauen (n=4, drittes Trimester)	29 \pm 6.08	30.25 \pm 0.50
<i>Gewebeproben</i>	<i>Alter</i>	<i>Schwangerschaftswoche</i>
Normal schwangere Frauen (n=19)	29.47 \pm 6.90	10.11 \pm 2.84
Patientinnen mit Spontanabort (n=21)	33.69 \pm 6.21	8.46 \pm 2.45
Patientinnen mit extrauteriner Schwangerschaft (n=15)	30.33 \pm 6.41	4.26 \pm 1.82

3.2.3.2 Isolierung von menschlichen primären Trophoblastzellen

Die Isolierung von primären Trophoblastzellen aus Humanplazenten erfolgte entsprechend dem Protokoll von Hirota und Kollegen^[252]. Die Isolierung wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Das gesamte Gewebematerial wurde zunächst in kaltem PBS vom Blut gesäubert und anschließend mit einem Skalpell in 1 mm³ große Stücke zerkleinert. Das zerkleinerte Gewebe wurde für 30 Minuten bei 37 °C auf dem Schüttler in 30 ml Verdauungslösung inkubiert. Anschließend wurde das verdauten Gewebe durch ein 100 μ m Nylonnetz gefiltert. Die Zellsuspension wurde bei 1500 rpm für 5 Minuten bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 4 ml Medium 199 resuspendiert und auf 3 ml LSM geschichtet. Mittels Dichtegradientenzentrifugation bei 1000 rpm für 15 Minuten (ohne Bremseinwirkung) reichernten sich die Trophoblastzellen in der Interphase an. Die Interphase wurde vorsichtig abgenommen, in ein 15 ml Probenröhrchen überführt und mit 5 ml PBS aufgefüllt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 1500 rpm für 5 Minuten wurde das Zellpellet in 10 ml Medium 199 resuspendiert und die Zellen in einer Kollagen-beschichteten Zellkulturflasche (25 cm³) ausplattiert.

3.2.3.3 Einfrieren und Auftauen von primären Zellen und Zelllinien

Zum Einfrieren von adhärennten primären Zellen und Zelllinien wurde zunächst das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen, um Mediumrückstände zu entfernen. Dann wurden die Zellen mit Trypsin behandelt, welches durch Spaltung der extrazellulären Proteine die Zellen vom

Zellkulturflaschenboden löst. Die Inkubation in Trypsin (10 ml) dauerte in Abhängigkeit von der Stärke der Adhärenz der Zellen an den Zellkulturflaschenboden 1 bis 3 Minuten. Da eine zu lange Behandlung mit Trypsin zu einer Schädigung der Zellen führen würde, wurde die Zellsuspension anschließend sofort in 10 ml des entsprechenden Kulturmediums aufgenommen, wobei das im Kulturmedium enthaltene FKS zur Deaktivierung des Trypsins beitrug. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 1500 rpm für 6 Minuten wurde das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium pro 2×10^6 Zellen resuspendiert. Das im Einfriermedium enthaltene DMSO verhindert das Bilden von Eiskristallen während des Einfrierprozesses. Nach kurzer Lagerung bei -80°C wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt. Beim Auftauen wurden die Zellen nach Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff kurz auf Eis gelagert und dann sofort bei 37°C im Wärmewasserbad erwärmt. Die aufgetaute Zellsuspension wurde sofort in 15 ml vorgewärmtes Kulturmedium überführt und anschließend bei 1500 rpm für 6 Minuten zentrifugiert, um das für die Zellen toxische DMSO aus dem Überstand zu entfernen. Das Zellpellet wurde in 15 ml entsprechendem Kulturmedium resuspendiert und die Zellen ausplattiert.

3.2.3.4 Gewinnung von $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T_{reg}-Zellen und $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ T-Zellen mittels MACS[®]

Mit Hilfe des MACS[®] (*Magnetic Activated Cell Sorting*) ist es möglich, Zellsubpopulationen aus Gesamtzellpopulationen anzureichern. Das Prinzip beruht auf einer spezifischen AK-Markierung der a) zu depletierenden Zellfraktion (Negativselektion) oder b) anzureichernden Zellfraktion (Positivselektion). Paramagnetische Mikropartikel (*Micro Beads*) binden an die AK-markierten Zellen. Beim Passieren durch ein permanentes Magnetfeld werden markierte Zellen in einer Trennsäule mit magnetischen Eisenkugeln zurückgehalten, während unmarkierte Zellen die Säule durchqueren und im Durchfluss aufgefangen werden können. Nach Entfernen der Trennsäule aus dem magnetischen Feld können die an der Säule gebundenen Zellen eluiert werden. Im Falle der Anreicherung von $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T_{reg}-Zellen werden in einem ersten Schritt alle nicht CD4^+ T-Zellen mittels AK markiert. Hierfür wird ein Gemisch aus Biotin-konjugierten AK (anti-CD8a, -CD11b, -CD45R, -CD49b, -Ter-119) verwendet, an den spezifisch anti-Biotin Magnetkügelchen binden können. Gleichzeitig werden auch die CD25^+ T-Zellen von einem CD25 -PE konjugierten AK gebunden. Unter Wirkung des magnetischen Feldes verbleiben alle CD4^- T-Zellen auf der Säule, während die CD4^+ T-Zellen sich im Durchfluss anreichern (Negativselektion). In einem zweiten Schritt werden zu der CD4^+ Zellsuspension anti-Phycoerythrin (PE) Magnetkügelchen gegeben, die sich spezifisch an die vorher PE-markierten CD25^+ T-Zellen anlagern. Nach Einwirken des magnetischen Feldes verbleiben diese Zellen auf der Säule und

können anschließend eluiert werden (Positivselektion). Zur Erhöhung der Reinheit der CD25⁺ T-Zellen wurde die Positivselektion ein zweites Mal mit einer neuen Säule durchgeführt. Die CD4⁺CD25⁻ T-Zellen befanden sich nach der Positivselektion im Durchfluss.

3.2.3.4.1 Isolierung von CD4⁺CD25⁺ T_{reg}-Zellen und CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus menschlichem Blut

Für die Isolierung von menschlichen T_{reg}- und CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurde schwangeren Frauen ungefähr 40 ml Blut entnommen. Die Blutröhrchen wurden zunächst bei 2200 rpm für 10 Minuten zentrifugiert, um das Blutplasma vom zellulären Blutbestandteil zu trennen. Der zelluläre Anteil (ca. 2 ml) wurde mit 2 ml PBS vermischt. Zur Gewinnung von peripheren mononukleären Blutzellen wurde das Blut-PBS-Gemisch mit 4 ml Ficoll-Paque vorsichtig unterschichtet und anschließend mittels Dichtegradientenzentrifugation bei 1800 rpm für 20 Minuten (ohne Bremseinwirkung) aufgetrennt. Aus der Interphase ließen sich dann die peripheren mononukleären Blutzellen entnehmen. In einem zweimaligen Waschschrift in PBS wurden die Zellen gewaschen und anschließend in PBS aufgenommen. Die CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25⁻ T-Zellisolation erfolgte mit dem Humanem CD4⁺CD25⁺ Regulatorischen T-Zell-Isolations-Kit von Miltenyi Biotec.

3.2.3.4.2 Ausbeute und Reinheit der CD4⁺CD25⁺ T_{reg}-Zellen

Nach der Isolation wurde die Anzahl an T_{reg}-Zellen mit Hilfe einer Neubauerzählkammer ausgezählt und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Gesamtzellzahl} = M (\text{Mittelwert aus 4 Quadranten}) \times VF (\text{Verdünnungsfaktor}) \times V (\text{Volumen}) \times 10^4$$

Die Ausbeute an CD4⁺CD25⁺ T_{reg}-Zellen lag bei ungefähr 0,5-1 % der Ausgangszellzahl. Die Reinheit der Isolation wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt und betrug zwischen 80 – 95 %.

3.2.3.5 Transfektion von HCT116-Zellen mit hCG-Vektoren

Die Transfektion der Darmkrebszelllinie (HCT116) wurde von unseren Kooperationspartnern in Leipzig durchgeführt. Die vollständigen Kodierungssequenzen der DNAs für die Isomere 3 (NM_000737) und 7 (NM_033142) der β -Untereinheit des hCG-Moleküls sowie für die α -Untereinheit (NM_000735) des Moleküls wurden mittels PCR amplifiziert und als KpnI/XhoI-Fragmente in den Expressionsvektor pcDNA3.1 (+) kloniert. Die Transfektion der HCT116-Zellen mit

den Expressionsvektoren wurde mit dem Fugene HD Transfektionsreagenz entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Als Kontrollen wurden Zellen verwendet, die mit Expressionsvektoren transfiziert wurden, die LacZ oder das Grün-Fluoreszierende Protein (GFP) enthielten. 16 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen drei Mal mit sterilem PBS gewaschen und für das Migrationsassay in OPTI-MEM ausplattiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen als untere Zellschicht für das Migrationsassay eingesetzt.

3.2.3.6 Behandlung von JEG-3-Zellen mit hCG-siRNA

Für die Behandlung der Choriokarzinomzelllinie JEG-3 mit hCG-siRNA wurden die Zellen zunächst 24 Stunden vor der Transfektion in OPTI-MEM ausplattiert. Der Wechsel des Kulturmediums war notwendig, da Zusätze wie FKS und P/S die Transfektionseffizienz beeinflussen können. Die Zellen wurden in 24-Loch Platten in einer Konzentration von 4×10^4 Zellen in 400 μ l Medium pro Ansatz ausplattiert. Das Transfektionsreagenz siPORT NeoFX wurde in OPTI-MEM verdünnt (1 μ l NeoFX in 50 μ l OPTI-MEM pro Ansatz). Es erfolgte eine Inkubation für 10 Minuten bei RT. Die hCG-siRNAs (N° 294383 und N° 394384) wurden ebenfalls in OPTI-MEM verdünnt (7,5 μ l siRNA (2 μ M) in 50 μ l OPTI-MEM). Die Endkonzentration der siRNA betrug 30 nM pro Ansatz. Das Transfektionsreagenz wurde mit der siRNA vermischt und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde das siRNA/NeoFX-Gemisch zu den JEG-3-Zellen gegeben, die Kulturplatte für eine gleichmäßige Verteilung der siRNA mehrmals geschwenkt und in den Inkubator gestellt. Als Kontrollen dienten sowohl untransfizierte Zellen als auch Zellen, welche mit einer irrelevanten (unspezifischen) siRNA behandelt wurden. Nach 24 Stunden Inkubation wurde das Transfektionsmedium von den Zellen entfernt und durch frisches Kulturmedium ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die transfizierten Zellen für das Migrationsassay verwendet. Die Transfektionseffizienz wurde an Hand des verbliebenen hCG-Gehaltes im Zellkulturüberstand nach 48 Stunden mittels ELISA bestimmt.

3.2.3.7 Migrationsassay unter Verwendung des Transwell-Systems

Das Migrationsassay wurde zum einen mit hCG-produzierenden Zellen (primären Trophoblasten, JEG-3-Zellen oder hCG-transfizierten HCT116-Zellen) und zum anderen mit wenig oder nicht-hCG-produzierenden Zellen (siRNA-behandelte JEG-3-Zellen oder Keratinozyten (HaCat-Zellen)) durchgeführt. Untersucht wurde die Migration von T_{reg}-Zellen aus dem Blut von normal schwangeren Frauen des ersten und dritten Trimesters. Die Isolierung von T_{reg}-Zellen aus menschlichem Blut ist unter

3.2.3.4/3.2.3.4.1 erläutert. Die primären Trophoblasten sowie die unbehandelten und behandelten Zelllinien bildeten als adhärenente Zellen die untere Schicht im Transwell-System. Darüber befanden sich durch eine Filtermembran getrennt die isolierten T_{reg}-Zellen in Suspension (Abb.15).

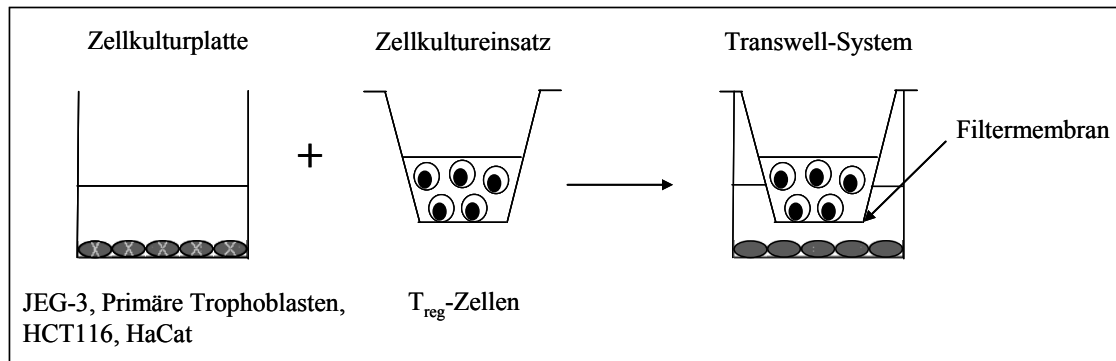


Abb. 15: Schematische Darstellung des Migrationsassays unter Verwendung des Transwell-Systems. JEG-3-Zellen, Primärtrophoblasten oder HaCat-Zellen dienten als untere adhärenente Zellschicht im Transwell-System. T_{reg}-Zellen, die aus dem Blut von normal schwangeren Frauen gewonnenen wurden, bildeten die obere Zellschicht im Transwell-System und waren durch einen Zellkultureinsatz mit Filtermembran von den adhärenenten Zellen getrennt. Die Migration der T_{reg}-Zellen durch die Filtermembran zu den adhärenenten Zellen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Durchflusszytometrie dokumentiert.

Entsprechend der Ausbeute an T_{reg}-Zellen nach der Isolation (siehe 3.2.3.4.2) wurden $2,5 \times 10^4$ bis 4×10^4 T_{reg}-Zellen pro Ansatz eingesetzt. Die Migration der T_{reg}-Zellen zu den hCG- bzw. nicht-hCG-produzierenden Zellen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 4, 8, 24 und 48 Stunden) bestimmt. Als Kontrolle dienten Ansätze, die ausschließlich T_{reg}-Zellen enthielten, um die Spontanmigration der T_{reg}-Zellen durch die Filtermembran zu bestimmen. Die absolute Anzahl an migrierten T_{reg}-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Hierfür wurden die Filtermembranen vorsichtig aus dem System entfernt und der Zellüberstand entnommen. Die adhärenenten primären Trophoblasten und Zelllinien verblieben größtenteils auf der Platte. Einzelne tote Zellen in Suspension konnten auf Grund ihrer Morphologie im Durchflusszytometer gut von den T_{reg}-Zellen unterschieden werden. Der Überstand jedes Ansatzes wurde im Durchflusszytometer vollständig vermessen und die Gesamtzellmenge im Überstand bestimmt. Der prozentuale Anteil an migrierten T_{reg}-Zellen konnte mit folgender Formel berechnet werden:

$$\% \text{ migrierter T}_{\text{reg}} - \text{Zellen} = \frac{\text{Gesamtzahl gemessener Zellen} - \text{Spontanmigration}}{\text{Menge eingesetzter Zellen}} \times 100 \%$$

3.2.3.8 Migrationsassay unter Verwendung einer 3D-Kollagenmatrix und computerunterstützte Verfolgung von Zellen

Das 3D-Kollagenmatrixassay wurde zur Visualisierung der T_{reg} -Zellmigration zu den JEG-3-Zellen mittels Videomikroskopie verwendet. 1×10^5 T_{reg} -Zellen und 1×10^5 JEG-3-Zellen wurden in 33 μ l RPMI-Medium und anschließend in 66 μ l Kollagen (Endkonzentration: 1,7 mg/ml) aufgenommen. Die Kollagenzelllösung wurde in eine kleine Kammer auf einem Objektträger gefüllt und polymerisierte im Inkubator bei 37 °C für 20 Minuten aus. Der verbleibende Freiraum in der Kammer wurde mit RPMI-Medium aufgefüllt und die Kammer mit Wachs verschlossen. Zur Videodokumentation wurden die Objektträger auf dem Objektivtisch befestigt. Die Visualisierung der Zellen wurde mit einem konventionellen Durchlichtmikroskop durchgeführt. Aufnahmen im Zeitraffer wurden verwendet, um die Zellbewegungen von 5-10 Zellen pro optisches Feld über einen Zeitraum von 16 Stunden mit einer Rate von drei Aufnahmen pro Minute zu dokumentieren. Anschließend wurde der Weg einer einzelnen T_{reg} -Zelle mit Hilfe der Aufnahmen rekonstruiert. Dafür wurden die Aufnahmen im Zeitraffer auf einem Computerbildschirm dargestellt. Die erste Aufnahme diente der Darstellung einer Mischung aus T_{reg} -Zellen und JEG-3-Zellen. Dann wurde der Weg einer einzelnen T_{reg} -Zelle mittels eines Steuerballs über einen spezifischen Zeitraum verfolgt.

3.2.3.9 *In vitro* Assay zur Bestimmung der Konvertierung von humanen $CD4^+CD25^-$ Foxp3⁻ T-Zellen in humane $CD4^+CD25^+$ Foxp3⁺ T_{reg} -Zellen

$CD4^+CD25^-$ T-Zellen wurden wie unter 3.2.3.4/3.2.3.4.1 beschrieben aus dem Blut von normal schwangeren Frauen des dritten Trimesters isoliert. Die isolierten Zellen wurden mit primären Trophoblasten, JEG-3- oder HaCat-Zellen kokultiviert. Als Kontrolle wurden ausschließlich $CD4^+CD25^-$ T-Zellen kultiviert. Die Konvertierung von $CD4^+CD25^-$ T-Zellen in T_{reg} -Zellen wurde an Hand des Anstiegs der T_{reg} -Marker Foxp3, CD25 und CTLA-4 nach 24, 48 und 72 Stunden mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Hierfür wurden die Zellen zu den genannten Zeitpunkten geerntet und mit CD25-, CTLA-4- und Foxp3-AK gefärbt (siehe 3.2.4.16.1).

3.2.3.10 Methoden zur Aufbereitung von immunologischen Färbungen

Die für die hCG- und Zytokeratinfärbung verwendeten Schnitte mit humanem Dezidua- und Plazentagewebe wurden uns freundlicherweise von unseren Kooperationspartnern aus Leipzig zur Verfügung

gestellt. Die Färbung wurde von Maria Dolaptchieva im Rahmen ihrer Studienjahresarbeit und von Stefanie Langwisch als Studentische Hilfskraft unter meiner Aufsicht durchgeführt.

3.2.3.10.1 Paraffineinbettung

Vollständige Implantationsstellen (Embryo und Plazenta) wurden nach ihrer Entnahme zunächst für 6 Stunden in 4 % PFA-Lösung mit Saccharose fixiert (siehe 3.2.4.3). Dann wurden die Proben in Einbettkassetten eingeschlossen und in ein 70 %iges Ethanolbad für 30 Minuten überführt. Nach 15 Minuten wurde der 70 %ige Ethanol erneuert. Es folgten zwei Ethanolbäder mit 80 % und 95 % Ethanolanteil für jeweils 15 Minuten bei RT. Um eine möglichst vollständige Entfernung des Wassers aus dem Gewebe zu erreichen wurden die Proben für 1 Stunde in 100 % Ethanol getaucht, wobei alle 15 Minuten das Ethanolbad erneuert wurde. Die Gewebeproben wurden anschließend zweimalig für 25 Minuten bei RT in ein Xylolbad gegeben, um den im Gewebe enthaltenen Alkohol zu entfernen. Das Xylol wirkte hierbei wie ein Intermedium, welches später durch Paraffin ersetzt wurde. Das Xylolbad wurde nach 25 Minuten erneuert. Anschließend wurden die Einbettkassetten in flüssiges Paraffin bei 56 °C überführt. Die Paraffinisierung wurde ÜN durchgeführt. Die paraffinisierten Proben wurden am nächsten Tag aus dem Paraffin entnommen, in der Einbettkassette mittig ausgerichtet und die Einbettkassette mit flüssigem Paraffin aufgefüllt. Zur Aushärtung des Paraffins wurden die gefüllten Einbettkassetten auf einen Kühlblock gelegt. Im festen Zustand ließ sich der geformte Paraffinblock aus der Kassette lösen und bei -20 °C lagern.

3.2.3.10.2 Paraffinschnitte

Die Paraffinblöcke sollten sich im gekühlten festen Zustand befinden, um gute Schnitte anfertigen zu können. Daher wurden die Blöcke vor und nach dem Schneiden auf Trockeneis gelagert. Nach dem Einspannen der Paraffinblöcke in die dafür vorgesehene Halterung wurden zunächst mit einem Messer 20 µm dicke Schnitte angefertigt, um die über dem Gewebe liegende Paraffinschicht zu entfernen. Nach Freilegen des gesamten Präparates wurde die Schnittdicke auf 5 µm verändert und von jeder Probe mindestens 5 Schnitte (je 2 Schnitte/Objektträger) hergestellt. Die beim Schneiden entstandenen Falten im Gewebe konnten durch einen kurzzeitigen Transfer der Objektträger in ein Warmwasserbad geglättet werden. Die Objektträger wurden getrocknet und für die folgende histologische Färbung bei RT aufbewahrt.

3.2.3.10.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die histologische Färbung mussten die zu färbenden Präparate zunächst deparaffinisiert werden, da das Paraffin eine Wechselwirkung zwischen dem Farbstoff und den anzufärbenden Zellstrukturen verhindert. Die Präparate wurden daher für 40 Minuten in ein Xylolbad (RT) gegeben, welches nach 20 Minuten erneuert wurde. Die Gewebekomponenten wurden in einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 95 %, 75 % Ethanol für je 10 Minuten bei RT) fixiert und hydratisiert. Alle Präparate wurden 30 Sekunden mit Hämatoxylin (Zellkernfärbung) und 10 Sekunden mit Eosin (Zytoplasmafärbung) gefärbt. Zwischen beiden Färbungen erfolgte die Bläuung (Zellkernfärbung) der Gewebeschnitte durch Überführen der Proben in lauwarmes Leitungswasser. Dann folgte eine ansteigende Alkoholreihe (75 %; 95 %; 100 % Ethanol), in der alle Präparate durch wiederholtes Senken und Heben (10 Mal) durch alle drei Alkoholstufen geführt wurden. Die Proben wurden für 2 x 5 Minuten in ein Xylolbad getaucht. Abschließend wurden die Präparate unter Verwendung von Roti-Histokitt mit einem Deckglas bedeckt, getrocknet und unter dem Durchlichtmikroskop ausgewertet.

3.2.3.11 Immunhistochemische Methoden

Das Prinzip der Immunhistochemie basiert auf einer Methode, bei der Proteine (Zielantigen) mit Hilfe von AK sichtbar gemacht werden können. In der vorliegenden Arbeit wird die Avidin-Biotin-Färbung verwendet. Hierbei bindet zunächst ein unkonjugierter Primär-AK an das Zielantigen. Anschließend kann sich der biotinylierte Sekundär-AK an das Fc-Fragment des Primär-AK heften. Dann erfolgt die Zugabe eines Avidin-Biotin-Enzymkonjugates. Das mit dem Enzym gekoppelte Avidin besitzt eine hohe Affinität zu dem Biotin am Sekundär-AK, worauf es zu einer Wechselwirkung zwischen dem Enzymkonjugat und dem Sekundär-AK kommt. Als Enzym wird die Meerrettich-Peroxidase verwendet. Sie oxidiert das zugegebene chromogene Substrat, wodurch es zu einem Farbumschlag kommt. Bei der Verwendung von AEC ist das Farbprodukt rotbraun. Da die Präzipitation des farbigen Produktes an der Stelle stattfindet, an der das Zielantigen markiert wurde, ist die Verteilung des Zielantigens im Gewebe bzw. in der Zelle genau lokalisierbar.

3.2.3.11.1 Zytokeratin- und hCG-Färbung

Die Zytokeratinfärbung diente der Differenzierung zwischen Dezidua *basalis* und Dezidua *parietalis* in den humanen Dezidua- und Plazentaprobe. Als Dezidua *basalis* wird der Teil des mütterlichen Endometriums bezeichnet, der mit dem Trophoblast direkt in Kontakt tritt. Zytokeratin-positive Zytotrophoblastzellen (Riesenzellen) wandern in das mütterliche Endometrium ein und ersetzen die En-

dothelzellen in den mütterlichen Spiralarterien. Der direkte Kontakt zwischen fötalem und mütterlichem Gewebe erfordert eine Anpassung der mütterlichen Immunantworten an den Fötus. Im Vergleich dazu bezeichnet man den restlichen Teil des schwangeren Uterus, der nicht mit dem Trophoblasten in Kontakt tritt, als *Dezidua parietalis*. Die Färbung ermöglichte im Folgenden die Zuordnung der hCG-positiven Zellen zu den verschiedenen Deziduabereichen. Für beide Färbungen wurden Schnitte verwendet, welche sowohl Dezidua- als auch Plazentagewebe enthielten. Vor der eigentlichen Färbung wurden die auf den Objektträgern aufgebrauchten Gewebeschnitte deparaffinisiert, fixiert und hydratisiert. Hierfür wurden die Paraffinschnitte zunächst 2 x 20 Minuten in Xylol (RT) getaucht. Anschließend erfolgte die Dehydratation des Gewebes in einer absteigenden Alkoholreihe. Die Proben wurden je 10 Minuten in 100 %, 95% und 75 % Ethanol getaucht. Die Hydratation der Schnitte erfolgte in 1 x TBS für 2 x 5 Minuten bei RT. Zur Freilegung des Zielantigens, welches durch die Paraffineinbettung möglicherweise verdeckt wurde, wurden die Gewebeschnitte entweder in Citratpuffer für 10 Minuten (Zytokeratin) oder in EDTA-Puffer für 5 Minuten (hCG) gekocht. Dann wurden die Schnitte 2 x 5 Minuten in 1 x TBS gewaschen. Für die Blockierung der endogenen Peroxidase wurde das Gewebe mit 50 µl 3 %igem H₂O₂ in Methanol bedeckt und für 20 Minuten in einer Feuchtekammer aufbewahrt. Dann erfolgte ein Waschschrift für 2 x 5 Minuten in 1 x TBS. Das anschließende Bedecken der Gewebeschnitte mit 50 µl 5 %igem BSA in TBS für 20 Minuten diente der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen. Die Primär-AK wurden folgendermaßen in 5 % BSA in TBS verdünnt: monoklonaler Maus anti-Human Zytokeratin AE1/AE3 AK 1/500 und polyklonaler Kaninchen anti-Human CG AK 1/600. Die Proben wurden für 60 Minuten bei RT für Zytokeratin oder ÜN bei 4 °C für hCG in der Feuchtekammer inkubiert. Nach der Färbung mit den Primär-AK wurden die Gewebeschnitte in 2 x 5 Minuten 1 x TBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe des biotinylierten Sekundär-AK. Dieser wurde entweder 1/500 (polyklonaler Ziege anti-Kaninchen Ig) oder 1/100 (Pferd anti-Maus IgG) in 5 % BSA in TBS verdünnt und auf die Proben (30 µl) gegeben. Die Inkubation mit dem Sekundär-AK erfolgte für 1 Stunde in der Feuchtekammer. Nach zweimaligem Waschen für 5 Minuten in 1 x TBS wurde die Avidin-gekoppelte Meerrettich-Peroxidase-Lösung hinzugegeben und die Proben für 30 Minuten in der Feuchtekammer inkubiert. Dann wurde das Gewebe für 2 x 5 Minuten in 1 x TBS gewaschen. Zur Visualisierung des Zytokeratins und hCG im Gewebe wurde das Substrat AEC zugegeben und für 7 Minuten auf den Gewebeschnitten belassen. Anschließend wurde das Substrat durch einen erneuten Waschschrift (2 x 5 Minuten in 1 x TBS) entfernt und die Gewebeschnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt. Die Anfärbung der Zellkerne mittels Hämatoxylin erfolgte für 30 Sekunden in der Feuchtekammer. Die Gewebeschnitte wurden anschließend für 2 x 5 Minuten in Leitungswasser getaucht. Für die Bedeckung der Gewebeschnitte mit Deckgläsern wurde das wässrige

Medium Aquatex verwendet. Als Negativkontrollen dienten Gewebeschnitte bei denen der Primär-AK durch 5 % BSA in TBS ersetzt wurde oder Schnitte, die mit verdünntem Maus- oder Kaninchenserum behandelt wurden.

3.2.3.11.2 Auswertung der immunhistochemischen Färbung

Zunächst wurde eine Skala von null bis sechs zur semiquantitativen Bestimmung der Farbintensität an Hand mehrerer Proben sowie einer Positiv- und Negativkontrolle erstellt. Die einzelnen Ziffern waren mit folgender Farbintensität der Probe gleichbedeutend. 0- keine Färbung, 1- schwache, 2- mäßige, 3- starke, 4- intensive, 5- intensivere und 6- sehr intensive Rot-Braunfärbung. Die Bewertung der Farbintensität wurde „blind“ (verdecktes Schriftfeld am Objektträger) von zwei verschiedenen Personen unter dem Lichtmikroskop (X200 Vergrößerung: 20 Objektiv x 10 Okular) durchgeführt. Beurteilt wurde die Färbung von zwei verschiedenen Deziduabereichen, Dezidua *basalis* und Dezidua *parietalis*. Anschließend wurde der Mittelwert aus beiden Bewertungen berechnet. Repräsentative Gewebesausschnitte wurden fotografiert und sind im Ergebnisteil dargestellt.

3.2.3.12 Immunfluoreszenzfärbung

Bei dieser Methode nutzt man die Eigenschaften von Fluorochromen, um eine spezifische Antigen-AK-Reaktion nachzuweisen. Bei der Färbung des LH/CG Rezeptors handelt es sich um eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung, da der mit dem Fluorochrom-markierte AK nicht direkt mit dem Zielantigen interagiert, sondern indirekt über einen Detektor-AK, welcher seinerseits mit dem Zielantigen reagiert hat.

3.2.3.12.1 Färbung des LH/CG-Rezeptors

Zur Detektion des LH/CG Rezeptors auf T_{reg}-Zellen wurden die Zellen aus dem Blut von normal schwangeren Frauen des dritten Trimesters isoliert (siehe 3.2.12/3.2.12.1) und für 24 Stunden mit JEG-3-Zellen kokultiviert. Nach der Kokultur wurden die T_{reg}-Zellen mit 1 % BSA in PBS gewaschen und mit polyklonalem Kaninchen anti-Human LH/CG Rezeptor AK in einer Verdünnung von 1/200 in 1 % BSA in PBS für 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen mit Fluorescein (FITC)-konjugierten Ziege anti-Kaninchen AK für 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach einem erneuten Waschschritt wurden die T_{reg}-Zellen auf einem Objektträger ausgestrichen. Der Zellausstrich wurde nach kurzem Trocknen in 100 % Methanol für 10 Minuten im Dunkeln fixiert. Abschließend wurden die Zellen mit einem gebrauchsfertigen Einbettmedium für

Fluoreszenz mit DAPI eingedeckelt. Zellausstriche, bei denen der primäre AK durch 1 % BSA in PBS ersetzt wurde, dienten als Negativkontrollen. Die Färbung der T_{reg}-Zellen wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops analysiert. Fluoreszenzbilder von LH/CG Rezeptor-positiven T_{reg}-Zellen wurden in einer Vergrößerung von X400 (40 Objektiv x 10 Okular) aufgenommen und sind im Ergebnisteil dargestellt.

3.2.3.13 Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Bei dieser Methode handelt es sich um ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf der Sandwichtechnik basiert. Die Löcher der Mikrotiterplatten sind mit einem monoklonalen AK beschichtet, der gegen eine definierte AK-Bindungsstelle des β -hCG-Moleküls gerichtet ist. Die Proben werden in die beschichteten Löcher gegeben und mit einem Enzymkonjugat inkubiert. Das Konjugat enthält einen anti-hCG-AK, der mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist. Es wird ein Sandwichkomplex gebildet. Das nicht-gebundene Konjugat wird durch Auswaschen aus den Löchern entfernt. Anschließend wird die Substratlösung zugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt. Die Intensität der Farbe ist proportional der hCG/ β -hCG-Konzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplattenleser gemessen.

3.2.3.13.1 ELISA zum Nachweis von β -hCG

Zellkulturüberstände von unbehandelten und mit siRNA-behandelten JEG-3-Zellen, primären Trophoblasten und HaCat-Zellen wurden auf ihren β -hCG-Gehalt mit Hilfe des β -hCG ELISA Kits analysiert. Zunächst wurden jeweils 25 μ l der Proben, einer Positivkontrolle und der Kalibratoren (Standardkurve) in je ein Loch einer 96-Lochplatte gegeben. Alle Proben, Kontrollen und Kalibratoren wurden als Doppelbestimmungen ermittelt. Dann wurden 100 μ l Enzym-Konjugat in jedes Loch gegeben, die Platte für 10 Sekunden gut geschüttelt und anschließend für 60 Minuten bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Inhalt der Platte verworfen und die Proben fünf Mal mit destilliertem Wasser gewaschen. Bei diesem Schritt war entscheidend, dass die Waschlösung durch Ausklopfen der Platte auf saugfähigem Papier vollständig entfernt wurde. Anschließend wurden 100 μ l Substratlösung in jedes Loch gegeben. Nach 15 Minuten Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 μ l Stop-Lösung beendet. Der Farbumschlag wurde bei 450 nm innerhalb von 10 Minuten gemessen.

Die Berechnung des β -hCG-Gehaltes erfolgte an Hand folgender Formel:

$$\text{Konzentration der Probe [mIU/ml]} = \frac{\text{Optische Dichte der Probe [450 nm]}}{\text{Anstieg der Eichgerade}}$$

3.2.4 Versuchsteil III: Einfluss des Schwangerschaftshormons Choriongonadotropin auf die Generierung, Migration und Funktion von T_{reg}-Zellen unter Verwendung von Mausproben

3.2.4.1 Bestimmung des Einflusses von hCG auf die Expansion der T_{reg}-Zellen

Zur Bestimmung des Einflusses von hCG auf die T_{reg}-Zellexpansion wurde das gut etablierte immunologische Abortmodell verwendet. Das Modell setzt sich aus zwei Verpaarungskombinationen zusammen. Die Verpaarung von weiblichen CBA/J-Mäusen mit BALB/c-Männchen führt zu einer normalen Schwangerschaft mit gesunden Feten und Plazenten. Der Median der Abortrate beträgt bei dieser Verpaarung 0 %. Im Gegensatz dazu treten bei der Verpaarung von CBA/J-Weibchen mit DBA/2J-Männchen neben gesunden Feten vermehrt Aborte auf. Der Median der Abortrate liegt bei dieser Verpaarung zwischen 20-30 %. Zur Durchführung der Experimente wurden CBA/J-Weibchen entweder mit BALB/c- oder mit DBA/2J-Männchen verpaart. Nach Detektion des Vaginalpfropfens wurden den Tieren entweder 100 μ l 10 IU/ml hCG oder 100 μ l PBS intra peritoneal injiziert. Die Injektionen erfolgten an den Schwangerschaftstagen 0, 2, 4 und 6. Am Tag 10 der Schwangerschaft wurden die Mäuseweibchen getötet und die Menge an T_{reg}-Zellen mittels Durchflusszytometrie in verschiedenen Organen bestimmt (Abb.16).

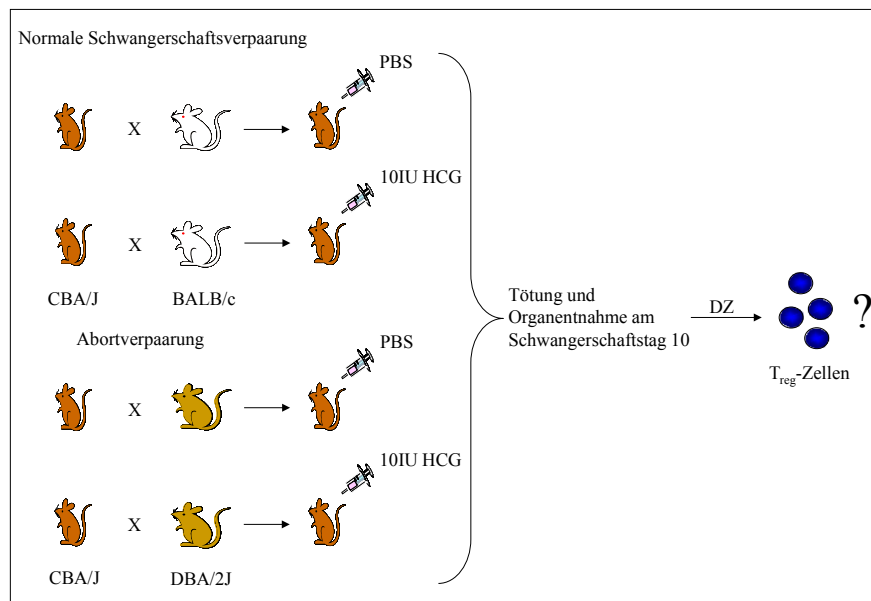


Abb. 16: Schematische Darstellung der Mausverpaarungen zur Untersuchung des Anstiegs an T_{reg} -Zellen nach hCG-Injektion. CBA/J-Weibchen wurden mit BALB/c- oder DBA/2J-Männchen verpaart und an den Schwangerschaftstagen 0, 2, 4 und 6 mit 10 IU/ml hCG oder PBS intra peritoneal behandelt. Am Schwangerschaftstag 10 wurden die CBA/J-Weibchen getötet und die Anzahl an T_{reg} -Zellen in verschiedenen Organen mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

3.2.4.2 Anästhesie und retro-orbitale Blutentnahme

Für die retro-orbitale Blutentnahme wurden die Mäuseweibchen mittels eines Ketamin/Rompungemisches (50 mg/ml Ketamin; 2 % Rompun) anästhesiert. Hierfür wurde das Anästhetikum 1 zu 4 in NaCl-Lösung verdünnt und subkutan (unter die Haut) in das rechte Bein der Maus injiziert. Die Wirkung des Anästhetikums wurde durch Reizung der vorderen und hinteren Gliedmaßen mit einer Pinzette getestet. Im narkotisierten Zustand wurde dem Tier aus einem Auge mittels Heparinbeschichteter Blutgaskapillaren 1-1,5 ml Blut entnommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Blutproben wurden bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

3.2.4.3 Präparation und Probennahme

Nach der Blutentnahme wurden die Tiere vor dem Aufwachen aus der Narkose durch Genickbruch getötet. Im Falle einer späteren Isolierung von T_{reg} -Zellen wurden alle folgenden Arbeitsschritte unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Mäuse wurden fixiert, das Tierfell mittels Alkohol desinfiziert und dann ausgehend vom Abdomen längs zum Thorax hin eröffnet. Die Haut wurde seitlich fixiert und

die inguinalen und axialen Lymphknoten entnommen. Nach Eröffnung der inneren muskulären Bauchwand konnten die mesenterischen und paraaortischen Lymphknoten entnommen werden. Bei trächtigen Tieren wurde der bikorneale Uterus freipräpariert, entnommen und beiderseits eröffnet. Die Lage und Anzahl der einzelnen Implantationen und Resorptionen wurden dokumentiert. Resorptionen erscheinen optisch als wesentlich kleinere nekrotisch-hämorrhagische Gebilde und sind daher von normal entwickelten Embryonen und Plazenten gut zu unterscheiden. Alle Plazenten mit dazugehörigem Embryo und die Resorptionen wurden von der Dezidua getrennt. Eine Plazenta wurde von ihrem Embryo getrennt, in kaltem sterilen PBS gewaschen und anschließend für die RNA-Isolierung in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die weitere Lagerung der Proben erfolgte bei -80 °C. Eine weitere Plazenta sowie eine gesamte Implantationsstelle wurden für die spätere Einbettung in Paraffin für 6 Stunden in 4 % PFA mit Saccharose bei RT gelagert. Von der Dezidua wurden für die RNA-Isolierung kleine Stücke abgeschnitten, gewaschen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C eingefroren. Der verbleibende Anteil der Dezidua wurde für die Lymphozytenisolierung in kaltem PBS gewaschen, in kleine Stücke geschnitten und in ein 50 ml Probengefäß mit 5 ml HBSS-Medium gegeben. Des Weiteren wurden bei allen Mäusen die Milz und der Thymus entnommen. Hierfür wurden die Tiere weiter entlang des Sternums bis zur oberen Halsregion eröffnet. Beide Organe wurden zusammen mit den Lymphknoten in sterilem PBS gewaschen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml sterilem RPMI-Medium gegeben. Die Proben wurden bis zur Lymphozytengewinnung auf Eis gelagert.

3.2.4.4 Isolierung von Lymphozyten aus dem Blut

Der verbleibende zelluläre Bestandteil des Blutes wurde in Lysispuffer aufgenommen und in mehreren Schritten in ein 50 ml Probengefäß überführt. Das Probengefäß wurde bis auf 50 ml mit Lysispuffer aufgefüllt. Der Puffer bewirkte innerhalb der nächsten 10 Minuten bei RT die Lyse der Erythrozyten, die sich nach anschließender Zentrifugation bei 1200 rpm für 10 Minuten im Überstand befanden und von dem Lymphozytenpellet am Boden des Probengefäßes getrennt werden konnten. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit RPMI-Medium gewaschen, um noch verbliebene Erythrozyten zu entfernen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 1200 rpm für 10 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml FKS-haltigem RPMI-Medium resuspendiert. Die Lymphozytensuspension wurde bis zur AK-Färbung (siehe 3.2.4.16.1) auf Eis gelagert.

3.2.4.5 Isolierung von Lymphozyten aus Milz, Thymus und Lymphknoten

Die Organe wurden nach kurzerzeitiger Lagerung auf Eis unter Zugabe von 5 ml RPMI-Medium auf ein 100 µm Nylonnetz gegeben. Mit Hilfe eines Spritzenstempels wurden die Gewebeproben durch das Nylonnetz gerieben und die erhaltene Zellsuspension in je einem Loch einer 6-Lochplatte aufgefangen. Die Suspensionen wurden mittels einer Pasteurpipette in ein Probengefäß überführt und dieses auf 50 ml mit Lysispuffer aufgefüllt. Nach einer Inkubation für 10 Minuten bei RT und einem Zentrifugationsschritt bei 1200 rpm für 10 Minuten konnten die lysierten Erythrozyten (Überstand) von dem Zellpellet, vorwiegend bestehend aus Lymphozyten, getrennt werden. Das Zellpellet wurde in RPMI-Medium gewaschen, der Überstand verworfen und dann in 1 ml FKS-haltigem RPMI-Medium aufgenommen. Die Lymphozytensuspension wurde bis zur AK-Färbung (siehe 3.2.4.16.1) auf Eis gelagert.

3.2.4.6 Isolierung von Lymphozyten aus Uterus und Dezidua

Das kurzzeitig auf Eis gelagerte Probengefäß mit dem zerkleinerten Deziduagewebe wurde mit DTT-HBSS-Medium auf 50 ml aufgefüllt. Der Zusatz von DTT bewirkte eine Lockerung des Gewebes, wodurch Lymphozyten aus der Dezidua freigesetzt werden konnten. Dieser Prozess wurde durch eine 20 minütige Inkubation in einem Warmwasserbad bei 37 °C unterstützt, wobei das Probengefäß alle 5 Minuten mehrmals invertiert wurde, um eine bessere Durchmischung des DTT mit dem Gewebe zu gewährleisten. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension mit einer Pasteurpipette durch ein 100 µm Nylonnetz in ein zweites 50 ml Probengefäß gegeben. Die im ersten Probengefäß verbleibenden Gewebestücke wurden mit HBSS versetzt und weitere 20 Minuten inkubiert. Das zweite Probengefäß wurde bei 1200 rpm für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das erhaltene Zellpellet kurzzeitig auf Eis gelagert. Dieser Vorgang wurde drei Mal wiederholt, wobei jeweils die Suspension des ersten Probengefäßes in das zweite Probengefäß überführt wurde. Nach dem dritten Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in 5 ml RPMI-Medium aufgenommen. Die Trennung der Lymphozyten von den restlichen zellulären Bestandteilen erfolgte durch eine vorsichtige Unterschichtung der Zellsuspension mit 3 ml Lympholyte M[®]. Mit der sich anschließenden Dichtegradientenzentrifugation bei 2400 rpm für 20 Minuten (ohne Bremseinwirkung) wurden die Lymphozyten in der Interphase angereichert. Mit Hilfe einer Pasteurpipette konnten die Lymphozyten aus der Interphase vorsichtig entfernt und in ein 15 ml Probengefäß überführt werden. Nach Zugabe von 5 ml FKS-haltigem RPMI-Medium wurde die Lymphozytensuspension ein weiteres Mal zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml FKS-haltigem RPMI-Medium resuspendiert und bis zur AK-Färbung (siehe 3.2.4.16.1) auf Eis gelagert.

3.2.4.7 Isolierung von $CD4^+CD25^+$ T_{reg}-Zellen und $CD4^+CD25^-$ T-Zellen aus Mausgewebe

Die $CD4^+CD25^+$ und $CD4^+CD25^-$ T-Zellisolierung erfolgte mit dem Maus $CD4^+CD25^+$ Regulatorischen T-Zell-Isolations-Kit von Miltenyi Biotec wie unter 3.2.3.4 beschrieben. Als Quelle für die Isolierung wurde ein Gemisch aus Thymus und Milz oder Milz und Lymphknoten oder nur der Thymus verwendet. Die Organe waren zuvor unter sterilen Bedingungen aus der Maus entnommen und in 1 ml RPMI-Medium auf Eis gelagert worden.

3.2.4.8 Gemischte Leukozyten Reaktion (Mixed Leucocyte Reaction, MLR)

Die MLR dient als *in vitro*-Modell zur Aktivierung von T-Zellen mittels APZ, die den T-Zellen Antigene präsentieren und sie somit zur Proliferation anregen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden als APZ mit Mitomycin C behandelte Zellen aus Milz und Lymphknoten von DBA/2J-Männchen verwendet. Mitomycin C hemmt nach einer enzymatischen Aktivierung die DNA-Synthese, sodass eine Teilung der Zelle nicht mehr möglich ist. Dieser Schritt ist für die MLR entscheidend, da die aus den Männchen gewonnenen APZ nur der Aktivierung der kokultivierenden Zellen dienen und eine Eigenproliferation dieser Zellen unerwünscht ist. Die T-Zellen (T_{reg}-Zellen und $CD4^+CD25^-$ T-Zellen) wurden aus lymphatischen Organen von schwangeren CBA/J-Mäusen (Tag 10 der Schwangerschaft) gewonnen, welche zuvor mit DBA/2J-Männchen verpaart worden waren. Die CBA/J-Weibchen wurden im Verlauf ihrer Schwangerschaft entweder mit 10 IU/ml hCG oder PBS behandelt. Die Kokultur der APZ mit den $CD4^+CD25^-$ T-Zellen führte zu einer Aktivierung der Letztgenannten, deren Proliferation mit Hilfe des Farbstoffes CFDA-SE gemessen wurde. Durch Zugabe von T_{reg}-Zellen sollte die Proliferation der $CD4^+CD25^-$ T-Zellen gehemmt werden.

3.2.4.9 Gewinnung von APZ aus DBA/2J-Männchen zur Aktivierung von $CD4^+CD25^-$ T-Zellen

DBA/2J-Männchen wurden Milz und Lymphknoten (inguinal und paraaortisch) entnommen und aus dem Gemisch beider Organe Lymphozyten (siehe 3.2.4.5) gewonnen. Die Lymphozytensuspension wurde zunächst einmalig in FKS-haltigem RPMI-Medium und dann zwei Mal in RPMI-Medium ohne Zusätze gewaschen. Anschließend wurde die Zellsuspension in einem Mitomycin C-RPMI-Gemisch (50 µg/ml für 10^7 Zellen) für 30 Minuten bei 37 °C im Inkubator behandelt. Nach der Inkubation wur-

den die Zellen drei Mal in FKS-haltigem RPMI-Medium gewaschen. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen bis zur Durchführung der MLR in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.2.4.10 Isolierung von $CD4^+CD25^+$ T_{reg}-Zellen und $CD4^+CD25^-$ T-Zellen

Die Isolation der $CD4^+CD25^+$ T_{reg}-Zellen und $CD4^+CD25^-$ T-Zellen erfolgte wie unter 3.2.3.4/3.2.4.7 beschrieben. Als Ausgangsmaterial diente zum einen ein Gemisch aus Milz und Lymphknoten (inguinal und paraaortisch) und zum anderen der Thymus.

3.2.4.11 Messung der Lymphozytenproliferation mittels CFDA-SE

Carboxyfluoresceindiacetatsuccinimidylester (CFDA-SE) ist ein zelldurchlässiger Farbstoff, der Zellen durch Diffusion betritt und dann durch intrazelluläre Esterasen gespalten wird, um aminreaktive Produkte zu bilden. Dieses Produkt produziert eine detektierbare Fluoreszenz und bindet kovalent an intrazelluläre Lysinreste und andere Aminquellen. Wenn eine gefärbte Zelle sich teilt, wird der Farbstoff gleichermaßen auf die zwei Tochterzellen aufgeteilt, sodass die CFDA-SE Konzentration in den Tochterzellen ungefähr der Hälfte derjenigen in der Mutterzelle entspricht. Die Fluoreszenz kann mittels Durchflusszytometrie gemessen werden. Jeder Fluoreszenzpeak repräsentiert dabei eine weitere Teilung der Zellen (Abb.17). Die Fläche unter dem Peak entspricht der Zellzahl eines Teilungszyklus, sodass die Proliferationsrate der Zellen über die Zeit bestimmt werden kann.

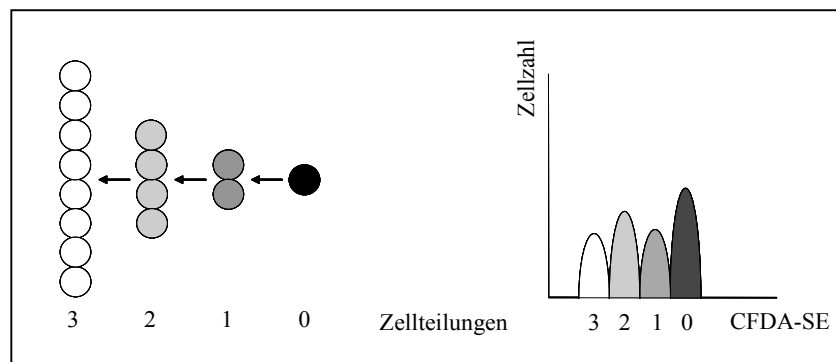


Abb. 17: Schematische Darstellung der Färbung von Lymphozyten mit CFDA-SE. Die Ausgangspopulation (Mutterzellen) nehmen den Farbstoff (CFDA-SE) über Diffusion auf. Bei jeder Zellteilung gibt die Mutterzelle jeweils 50 % des Farbstoffes an die beiden Tochterzellen ab. Daher nimmt die Intensität des Farbstoffes bei jeder Zellteilung von Generation zu Generation jeweils um die Hälfte ab und die einzelnen Tochterzellpopulationen können als separate Fluoreszenzpeaks dargestellt werden. Die Fläche unter dem Fluoreszenzpeak entspricht der Zellzahl eines Teilungszyklus, sodass die Proliferation der Zellen über die Zeit hinweg bestimmt werden kann. Die Messung des Farbstoffes erfolgt mittels Durchflusszytometrie.

Nach der Isolierung wurden die T_{reg} -Zellen in 100 μ l FKS- und P/S-haltigem RPMI-Medium aufgenommen und für die Zeit der Färbung der $CD4^+CD25^-$ T-Zellen in den Inkubator gestellt. Die $CD4^+CD25^-$ T-Zellen wurden zweimalig mit PBS gewaschen und anschließend in 1 μ M CFDA-SE-Färbelösung in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml Färbelösung für genau 1 Minute 30 Sekunden gefärbt. Anschließend wurden die Zellen drei Mal in 10 ml FKS- und P/S-haltigem RPMI-Medium gewaschen, um Reste des CFDA-SE zu entfernen. Auf Grund der toxischen Wirkung des CFDA-SE ist das Entfernen des Farbstoffs von entscheidender Bedeutung, da sonst mit einem erhöhten Zelltod zu rechnen ist.

3.2.4.12 Kokultur von APZ, T_{reg} -Zellen und $CD4^+CD25^-$ T-Zellen

Jeweils 1×10^5 Zellen der verschiedenen Zellpopulationen wurden miteinander in zwei Ansätzen kultiviert. Ansatz 1 beinhaltete APZ und $CD4^+CD25^-$ T-Zellen. Ansatz 2 beinhaltete APZ, $CD4^+CD25^-$ T-Zellen und T_{reg} -Zellen. Beide Ansätze wurden für die Zeitpunkte 0, 24 und 48 Stunden als Doppelbestimmungen angelegt. Die MLR wurde jeweils drei Mal für hCG- und PBS-behandelte Tiere durchgeführt. Die Proliferation der $CD4^+CD25^-$ T-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Abb.18).

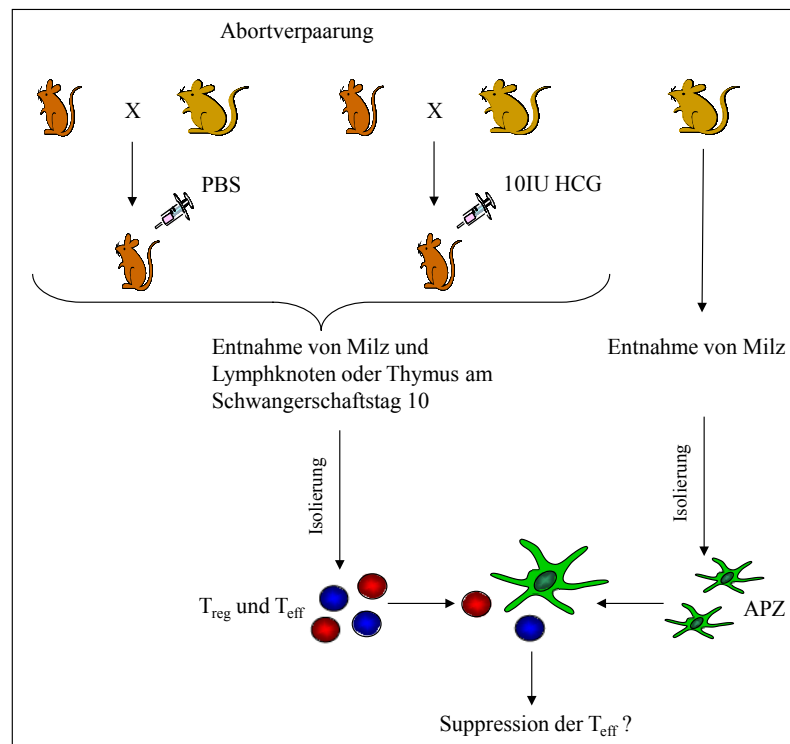


Abb. 18: Schematische Darstellung zur Durchführung der MLR. CBA/J-Weibchen wurden mit DBA/2J-Männchen verpaart und an den Schwangerschaftstagen 0, 2, 4 und 6 mit 10 IU/ml hCG oder PBS intra peritoneal behandelt. Am Schwangerschaftstag 10 wurden die Mäuseweibchen getötet und Milz, Lymphknoten und Thymus entnommen. T_{reg}-Zellen (T_{reg}) und Effektor T-Zellen (T_{eff}) wurden aus einem Gemisch aus Milz und Lymphknoten oder aus dem Thymus isoliert. Beide Zellpopulationen wurden anschließend in einer gemischten Leukozytenreaktion (MLR) mit Antigen-präsentierenden Zellen (APZ), die zuvor aus einem Gemisch aus Milz und Lymphknoten von DBA/2J-Männchen gewonnen wurden, kokultiviert. Die Proliferation der T_{eff} wurde durch Färbung mit CFDA-SE mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

3.2.4.13 Gewinnung von Milz- und Deziduazellen mittels enzymatischen Verdau

Zur Charakterisierung von DZ (CD11c⁺) sowie für die Kokultivierung zwischen DZ und CD4⁺ T-Zellen wurden CD11c⁺-Zellen aus Milz und Dezidua nach Behandlung von Abortmäusen mit hCG oder PBS isoliert. CBA/J-Weibchen wurden mit DBA/2J-Männchen verpaart, an den Schwangerschaftstagen 0, 2, 4 und 6 mit 10 IU/ml hCG oder PBS intra peritoneal behandelt und am Schwangerschaftstag 10 getötet. Die Isolierung von Deziduazellen wurde entsprechend dem Protokoll von Blois und Kollegen mit einigen Modifikationen durchgeführt^[253]. Milz und Dezidua (ohne Embryonen und Plazenten) wurden entnommen und in kleinen Stücken in 2 ml Reaktionsgefäße mit Verdauungslösung überführt. Der enzymatische Verdau fand bei 37 °C für 20 Minuten im Wärmewasserbad statt. An-

schließlich wurde die mit Zellen angereicherte Verdauungslösung und das restliche Gewebe durch Nylonnetze (100 μm für Deziduazellen, 70 μm und 40 μm für Milzzellen) filtriert. Das restliche Gewebe wurde dabei unter Zugabe von 3 – 5 ml FKS- und P/S-haltigem RPMI durch das Nylonnetz gerieben. Es erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 1500 rpm für 10 Minuten bei 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets wurden in 1 ml (Milz) oder 5 ml (Dezidua) FKS- und P/S-haltigem RPMI resuspendiert. Mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden wie unter 3.2.4.6 beschrieben die Lymphozyten aus der Deziduazellsuspension gewonnen. Nach einem Wasch- und Zentrifugationsschritt wurde das Lymphozytenzellpellet in 1 ml FKS- und P/S-haltigem RPMI resuspendiert. Die Zellzahlen der isolierten Milz- und Deziduazellen wurden ermittelt. Die Isolierung von CD11c^+ -Zellen aus beiden Zellsuspensionen erfolgte mittels MACS[®].

3.2.4.14 Isolierung von CD11c^+ -Zellen aus Milz und Dezidua sowie CD4^+ T-Zellen aus lokalen Lymphknoten mittels MACS[®]

Die Anreicherung von CD11c^+ -Zellen aus den zuvor gewonnenen Milz- und Deziduazellsuspensionen erfolgte durch Markierung der Zellen mit CD11c MicroBeads (Miltenyi Biotec) und anschließender Trennung der CD11c^+ -Zellen von allen anderen Zellpopulationen durch eine Trennsäule. Die Ausbeute an CD11c^+ -Zellen betrug 10-20 % der Ausgangszellzahl. Die Isolation von CD4^+ T-Zellen wurde mit dem CD4^+ T-Zell-Isolations-Kit von Miltenyi Biotec durchgeführt. Als Ausgangsmaterial wurde eine Zellsuspension aus inguinalen und paraaortischen Lymphknoten verwendet. Die Lymphknoten wurden aus unbehandelten CBA/J-Weibchen, die zuvor mit DBA/2J-Männchen verpaart worden waren, am Tag 10 der Schwangerschaft entnommen. Die Lymphknoten wurden wie unter 3.2.4.5 erläutert aufbereitet.

3.2.4.15 Kokultur von CD11c^+ - Zellen mit CD4^+ T-Zellen

Die aus Milz oder Dezidua von hCG- oder PBS-behandelten Abortmäusen gewonnenen CD11c^+ -Zellen wurden mit CD4^+ T-Zellen aus den Lymphknoten unbehandelter Abortmäuse kokultiviert und die Proliferationsrate sowie die Foxp3-Expression der CD4^+ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Zur Bestimmung der Proliferation wurden die CD4^+ T-Zellen nach ihrer Isolierung mit CFDA-SE gefärbt. Die CD4^+ T-Zellen wurde in einem Verhältnis von 1×10^5 Zellen zu 1×10^5 CD11c^+ -Zellen aus der Milz oder in einem Verhältnis von 1×10^4 Zellen zu 1×10^4 CD11c^+ -Zellen aus der Dezidua kokultiviert. Zur Stimulation der Proliferation der CD4^+ T-Zellen wurde dem FKS- und

P/S-haltigem RPMI-Medium IL-2 in einer Konzentration von 10 ng/ml zugesetzt. Die Probenentnahme erfolgte nach 0, 24 und 48 Stunden.

3.2.4.16 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Verschiedene physikalische und chemische Zelleigenschaften werden simultan auf der Einzelzelebene gemessen. Relative Zellgröße, Granularität und verschiedene Fluoreszenzfarben können für viele tausend Zellen in kurzer Zeit ermittelt werden. Der Zellsuspension werden AK-Fluorochrom-Konjugate zugesetzt. Die AK sind gegen spezifische Antigene der Zellen gerichtet. Dadurch können beispielsweise Subpopulationen von Zellen (z.B. T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen und B-Lymphozyten) unterschieden bzw. deren Produktion intrazellulärer Moleküle (z.B. Zytokine) ermittelt werden. Zur Analyse wird die Zellsuspension über eine Stahlkapillare durch Überdruck in die Messküvette eingeführt. Beim Eintreten in die Messkammer werden die Zellen stark beschleunigt, wodurch sich Aggregate auftrennen. Die Zellen erreichen so den Analysepunkt, einen Argonlaser mit 488 nm Wellenlänge, aufgereiht wie an einer Perlenschnur, was als „hydrodynamische Fokussierung“ bezeichnet wird (Abb.19).

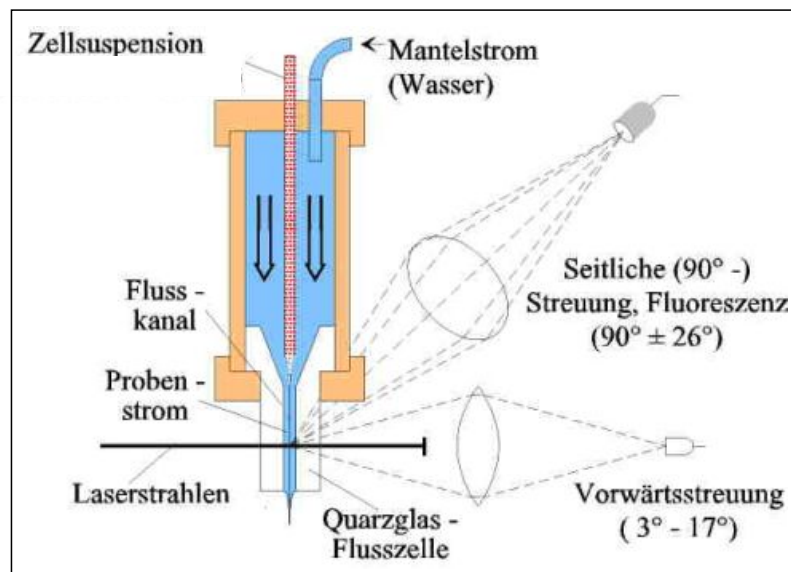


Abb. 19: Schematische Darstellung des Durchflusszytometers. (Quelle: www.facsclab.toxikologie.uni-mainz.de/zytometrie.jsp). Einzelne Zellen einer Zellsuspension werden durch Licht eines Argonlasers angeregt. Entsprechend ihrer Größe und Granularität streuen die Zellen das Licht unterschiedlich stark, wobei die Vorwärtstreue ein Maß für die Größe und die Seitwärtstreue ein Maß für die Granularität der Zelle darstellt. Fluoreszierende AK, die an spezifische Antigene auf der Zelloberfläche gebunden sind, emittieren das Licht in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen und ermöglichen eine Aussage über die Anzahl der Zellen, die das spezifische Antigen tragen und über die Menge des spezifischen Antigens auf einer Zelle.

Das Licht des Lasers wird durch die Zellen gestreut. Die Streuung des Lichtes wird durch die Zellgröße, die Struktur der Zellmembran sowie die intrazellulären Bestandteile beeinflusst. An Streulicht unterscheidet man das sogenannte Vorwärtstreulicht (*forward scatter*, FSC), das Streulicht längs zum Anregungslichtstrahl und das sogenannte Seitwärtstreulicht (*side scatter*, SSC), das Streulicht im rechten Winkel zu dieser Achse. Das Vorwärtstreulicht ist dabei in erster Linie ein Maß für die Zellgröße, während das Seitwärtstreulicht vor allem die intrazelluläre Granularität misst. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt entlang der Laserachse im 90°-Winkel. Die fluoreszierenden Stoffe absorbieren Licht in einem mehr oder weniger breiten Wellenlängenbereich. Dadurch werden Elektronen der äußeren Schalen auf ein höheres Energieniveau gehoben. Mit dem Rücksprung auf das ursprüngliche Niveau wird ein Photon abgegeben, es geht Schwingungs-Rotations-Energie verloren. Daher hat das emittierte Licht eine größere Wellenlänge (energieärmer) als das anregende Licht. Unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe haben unterschiedliche Absorptions- und Emissionsspektren. Die Emissionsspektren der Farbstoffe bestimmen nachfolgend die Kombinierbarkeit der Fluorochrome. Sie sollten

sich in ihren Wellenlängenbereichen möglichst wenig überschneiden, um sie trennscharf auswerten zu können. Durch Mehrfarbenfluoreszenz wird die Korrelation mehrerer Zelleigenschaften ermöglicht. In Tabelle 2 sind die in diesem Versuch verwendeten Farbstoffe zusammen mit ihren Exzitationsmaxima und Emissionsmaxima aufgeführt.

Tab. 2: Exzitations- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluorochrome (Quelle: www.bdbiosciences.com/documents/Multicolor_Fluorochrome_Specs.pdf)

Farbstoff	Ex _{max} (nm)	Em _{max} (nm)	Messkanal
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	494	519	FL1
Alexa Fluor 488 (AF)	495	519	FL1
Phycoerythrin (PE)	496, 564	578	FL2
Alexa Fluor 647 (AF)	650	668	FL4
Allophycocyanin (APC)	650	660	FL4

3.2.4.16.1 Extrazelluläre Färbung, Fixierung und intrazelluläre Färbung von Lymphozyten

Murine und humane Lymphozyten wurden zu gleichen Anteilen auf Rundbodenröhrchen aufgeteilt. Die Zellen wurden durch die Zugabe von 1 ml FACS-Puffer gewaschen und anschließend bei 1200 rpm für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Für die Markierung der Zelloberflächenantigene wurde der 1. AK entsprechend Versuchsteil (Tab.3) 1/100 in FACS-Puffer verdünnt. Je 100 µl der AK-Lösungen wurden in die entsprechenden Probenröhrchen gegeben und die Proben für 30 Minuten bei 4 °C bei Dunkelheit inkubiert.

Tab. 3: Zuordnung der verwendeten extrazellulären AK zu den entsprechenden Versuchsteilen

Versuchsteil	eingesetzte AK (extrazellulär)
3.2.3.9 Konvertierung von humanen CD4 ⁺ CD25 ⁻ Foxp3 ⁻ T-Zellen in humane CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ T _{reg} -Zellen	anti-CD25 (Mensch) anti-CTLA-4 (Mensch)
3.2.1.2, 3.2.2.2, 3.2.4.4, 3.2.4.5, 3.2.4.6 Expression verschiedener Oberflächenmarker auf Lymphozyten aus Vaginal-	anti-CD4 (Maus) anti-CD11c

schleim, Blut, Milz, Thymus, Lymphknoten, Uterus und Dezidua	(Maus) anti-CD80 (Maus) anti-I-A/I-E (Maus)
--	--

Nach der Inkubation wurde der nicht gebundene AK durch einen Waschschrift entfernt. Hierfür wurden die Proben zunächst mit 1 ml FACS-Puffer versehen, bei 1200 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Anschließend erfolgte die Fixierung der Lymphozyten ÜN durch die Zugabe von je 100 µl Fixierungslösung (Färbeset) zu jedem Röhrchen. Die Fixierung diente der Konservierung aller zellulären Bestandteile. Am nächsten Tag wurde die Fixierungslösung durch die Zugabe von 1 ml Permeabilisationspuffer (Färbeset), einen Zentrifugationsschritt bei 1200 rpm für 10 Minuten und die Verwerfung des Überstandes von den Zellen entfernt. Für die intrazelluläre Färbung musste die Zellmembran permeabilisiert werden, um dem AK das Eintreten in die Zelle zu ermöglichen. Der intrazelluläre AK wurde entsprechend Versuchsteil in Permeabilisationspuffer 1/100 verdünnt (Tab.4), wobei das im Permeabilisationspuffer enthaltene Saponin als Zellwandpermeabilisator wirkte. Je 100 µl der AK-Verdünnung wurden in die entsprechenden Probenröhrchen gegeben und die Proben 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert.

Tab. 4: Zuordnung der verwendeten intrazellulären AK zu den entsprechenden Versuchsteilen

Versuchsteil	eingesetzte AK (intrazellulär)
3.2.3.9 Konvertierung von humanen CD4 ⁺ CD25 ⁻ Foxp3 ⁻ T-Zellen in humane CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ T _{reg} -Zellen	anti-Foxp3 (Mensch)
3.2.1.2, 3.2.2.2, 3.2.4.4, 3.2.4.5, 3.2.4.6 Expression verschiedener Oberflächenmarker auf Lymphozyten aus Vaginalschleim, Blut, Milz, Thymus, Lymphknoten, Uterus und Dezidua	anti-Foxp3 (Maus)

Um nicht gebundene AK zu entfernen, wurden die Proben nach der Inkubation in 1 ml Permeabilisationspuffer gewaschen. Nach einem Zentrifugationsschritt und der Entnahme des Überstandes wurden die Zellen für die Messung in 100-200 µl FACS-Puffer aufgenommen. Als Negativkontrolle wurden

die Zellen mit 100 µl FACS-Lösung (extrazellulär) bzw. mit 100 µl Permeabilisationspuffer (intrazellulär) behandelt. Die aus menschlichem Blut isolierten T_{reg}-Zellen wurden zunächst unter Verwendung des anti-Human AK (1. AK) gegen den LH/CGR gefärbt. Nach einem zweimaligen Waschschrift mit PBS erfolgte die Färbung gegen den 1. AK mit FITC-gekoppelten anti-Kaninchen Immunglobulin (2. AK). Es erfolgte keine intrazelluläre Färbung. Die Zellen wurden direkt nach der doppelten extrazellulären Färbung ohne Fixierung im Durchflusszytometer vermessen.

3.2.4.16.2 Auswertung der Durchflusszytometrie

Die einzelnen Proben wurden mit Hilfe eines FACS Calibur (4 Farben-) Durchflusszytometer vermessen. Dieses Gerät ermöglichte eine Mehrfarbenfluoreszenzanalyse. Wie im oberen Teil erwähnt, musste daher darauf geachtet werden, dass sich die Emissionsspektren der verschiedenen Fluorochrome möglichst wenig überlappten, um Signale in Randbereichen der Spektren nicht doppelt zu detektieren. Durch Messung von Zellen, die mit jeweils nur einem Fluorochrom gefärbt waren, war es möglich, die Überlappungsbereiche zu kompensieren und die Emissionsspektren voneinander zu trennen. Die hierfür ermittelten Kompensationswerte wurden in allen weiteren Messungen beibehalten. Zur Kontrolle von unspezifischen Färbungen wurde die jeweilige Negativkontrolle mit ungefärbten Zellen gemessen. Isotypkontrollen wurden in diesem Versuch nur stichprobenartig durchgeführt, da diese von verschiedenen Arbeitsgruppen als nicht unbedingt notwendig erachtet werden und zum Teil konkret von ihnen abgeraten wird. Die Fluoreszenzintensität verhält sich proportional zur Menge an gebundenen AK pro Zelle, sodass an Hand der Messung der Intensität eine Aussage über die Höhe der Expression des AK-markierten Antigens getroffen werden kann (*Quelle: www.facsclab.toxikologie.uni-mainz.de/zytometrie.jsp*). Die vermessenen Zellen werden als Punktereignisse (*Dot plot*) nach ihrem Vorwärtsstreulicht und ihrem Seitwärtsstreulicht in einem FCS-SSC-Diagramm dargestellt (Abb.20). Die weitere Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm CellQuest Pro durch Markierung (*Gating*) der gewünschten Zellpopulation (Lymphozyten).

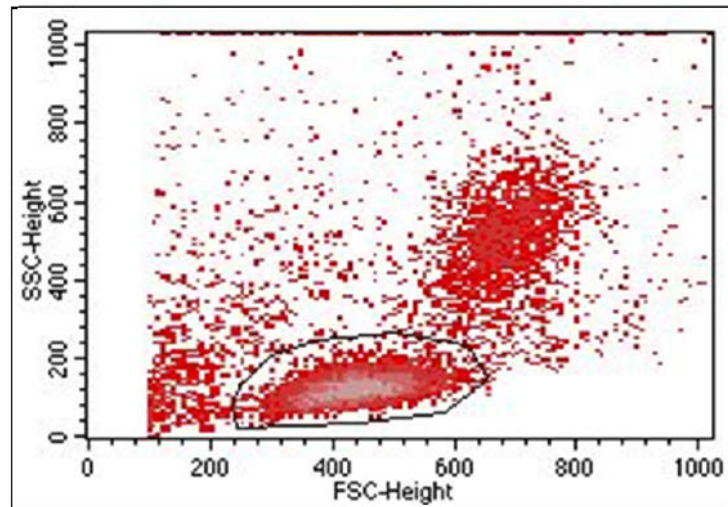


Abb. 20: Darstellung eines FSC-SSC-Diagramms. Das FSC-SSC-Diagramm stellt die Größe (FSC) und die Granularität (SSC) der Zellen dar. Kleinere Zellen mit wenig Granula (z.B. Lymphozyten) befinden sich links unten im Diagramm, wohingegen große Zellen mit viel Granula (z.B. Mastzellen) sich rechts oben im Diagramm befinden. Tote Zellen zeichnen sich ganz links unten im Diagramm ab.

Zunächst wurde die Negativkontrolle einer Probe gemessen und die vier Quadranten so bestimmt, dass mindestens 99 % der Zellen auf den linken unteren Quadranten entfielen und damit der Einfluss von Autofluoreszenz auf die Ergebnisse minimiert wurde (Abb.21(A)). Die Quadranteneinteilung wurde für die folgenden Auswertungen der Probe beibehalten. Bei Messung einer mit AK gefärbten Probe ließ sich nun zwischen einfach positiven (mit einem Fluorochrom gefärbt), doppelt positiven (mit 2 Fluorochromen gefärbt) sowie negativen (ungefärbt) Zellen unterscheiden (Abb.21(B)). Je nach Ansatz wurden in den Vaginalschleim-, Uterus-, Dezidua- und Blutproben je 10.000, in den Milz-, Thymus-, und Lymphknotenproben je 50.000 Zellen gemessen und nach Festlegung der Lymphozytenpopulation und der Quadranten die absolute Zellzahl pro Quadrant in ein relatives Verhältnis zur Summe der entsprechenden gemessenen Gesamtlmphozytenzahl gesetzt und in Prozent angegeben.

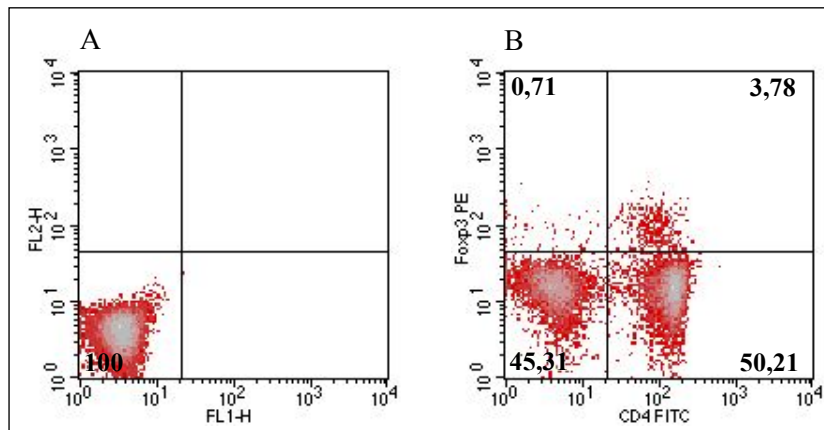


Abb. 21: Darstellung der Quadrantensetzung mit Hilfe des Computerprogramms CellQuest Pro. (A) Negativkontrolle und **(B)** Positivkontrolle mit Foxp3-einfach positiven Zellen im oberen linken Quadranten, CD4-einfach positiven Zellen im unteren rechten Quadranten sowie CD4Foxp3-doppelt positiven Zellen im oberen rechten Quadranten

3.2.4.17 Molekularbiologische Methoden

3.2.4.17.1 Isolierung von RNA

Je 100 mg der im flüssigen Stickstoff schockgefrorenen menschlichen Dezipua- und Plazentaprobe sowie Mausgewebeprobe wurden in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und mit 1 ml Trizol versetzt. Die Homogenisierung des Gewebes fand mit Hilfe eines Homogenisators statt. Neben der mechanischen Homogenisierung des Gewebes ermöglichte das Trizol nach der Freisetzung der zellulären Bestandteile die Proteine zu denaturieren und auszufällen. Die Homogenate wurden mit 200 µl Chloroform versetzt und das Gemisch mehrmals invertiert, um eine gleichmäßige Durchmischung zu erreichen. Die Zugabe von Chloroform bewirkte die Bildung und Stabilisierung der einzelnen Phasen, wobei sich die ausgefällten Proteine in der Interphase und die extrahierten Nukleinsäuren (vor allem RNA) in der oberen klaren Phase befanden. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 12000 rpm für 15 Minuten (4 °C) wurden die klaren Überstände in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß (RNase-frei) überführt und mit der gleichen Menge an Isopropanol versetzt. Die Präzipitation der RNA erfolgte entweder 20 Minuten bei RT oder ÜN bei -80 °C. Anschließend wurden die Proben bei 12000 rpm für 15 Minuten (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das erhaltene RNA-Pellet in 500 µl eiskaltem Ethanol gewaschen und die Proben erneut zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde zwei Mal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde das RNA-Pellet zum Trocknen unter einen Abzug gelegt. Durchscheinende RNA-Pellets wurden als trocken angenommen und in RNase-freiem Wasser

durch mehrmaliges Pipettieren resuspendiert. Die isolierte RNA wurde entsprechend der Größe des RNA-Pellets in 11 – 41 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen.

3.2.4.17.2 Photometrische Mengenbestimmung

Zur Bestimmung von Reinheit und Menge der RNA wurde eine 1/200 Verdünnung der RNA-Proben hergestellt. Danach wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm (RNA-Absorptionsmaximum) und 280 nm (DNA-Flanke und Proteinanteil) gemessen. Zur Prüfung der Reinheit wurde aus beiden Größen der Quotient gebildet. Der erhaltene Wert sollte möglichst zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Bei der Bestimmung der RNA-Konzentration wird davon ausgegangen, dass eine Extinktion von 1 bei 260 nm 40 µg/ml RNA entspricht^[254].

3.2.4.17.3 Herstellung von cDNA mittels reverser Transkription aus mRNA

Für die Synthese von cDNA wurde die aus den Geweben gewonnene RNA verwendet. Alle Proben wurden zunächst auf Eis aufgetaut. In einem 0,2 ml Reaktionsgefäß wurden je 2 µg RNA gegeben und mit der entsprechenden Menge an RNase-freiem Wasser auf 18 µl ergänzt. Nach der Zugabe von **2 µl** odTs (*Primer*), wurden die Proben geschüttelt und kurz zentrifugiert. Für die Anlagerung des Primers an das poly-A-Ende der mRNA folgte eine Inkubation von 10 Minuten bei 75 °C in einem Thermocycler. Die Proben wurden für 2 Minuten auf Eis gestellt und dann mit folgenden Reagenzien pro Ansatz versehen: **8 µl** Reverse-Transkriptase-Puffer; **4 µl** RNase-freies Wasser; **4 µl** 2,5 mM dNTPs; **2 µl** 2 U/µl DNase und **0,5 µl** 40 U/µl RNase-Inhibitor. Die nun folgende Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C diente dem Abbau der noch in der Probe enthaltenen DNA mit Hilfe der DNase. Diese wurde anschließend durch die Erwärmung der Proben auf 75 °C für 5 Minuten wieder denaturiert. Vor Zugabe von je **1 µl** 200 U/µl Reverse Transkriptase und **1 µl** 40 U/µl RNase-Inhibitor pro Ansatz wurden die Proben für 2 Minuten auf 4 °C gekühlt. Die reverse Transkription wurde 1 Stunde bei 42 °C durchgeführt. Der abschließende Inkubationsschritt für 5 Minuten bei 94 °C diente der Denaturierung und Inaktivierung aller im Ansatz enthaltenen Enzyme. Die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C eingefroren.

3.2.4.17.4 Real-time- (Echtzeit) PCR

Die "real-time" quantitative PCR (quantitative Echtzeit-PCR) stellt eine Weiterentwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dar. Die PCR ist eine sehr schnelle und sensitive Methode zur *in vitro*-Amplifizierung spezifischer DNA-Abschnitte und ermöglicht somit die

Detektion kleinster DNA-Mengen. Das Prinzip der PCR-Reaktion basiert auf der enzymatischen Vermehrung eines bestimmten DNA-Abschnittes (*Template*), der zwischen zwei spezifischen Startersequenzen, den so genannten Primern, liegt. Die Basenabfolge der beiden Primer muss komplementär zur amplifizierenden DNA-Sequenz sein. Weiterhin sollten die Primer eine Länge von 18 bis 30 Basen haben, einen G/C-Gehalt zwischen 20-80 % sowie eine Schmelztemperatur (T_m) von ca. 60 °C. Bei der Primerauswahl sollten Poly (T)-Bereiche, Haarnadelstrukturen und auch 3'-Komplementarität vermieden werden, da es sonst zu unspezifischen Bindungen oder Primerdimerbildung kommen kann. Binden die Primer an die komplementären DNA-Abschnitte, katalysiert das Enzym DNA-Polymerase die *in vitro*-DNA-Synthese. Die DNA-Synthese erfolgt in drei Schritten: Jeder Zyklus besteht aus 1) einem Denaturierungsschritt bei 95 °C, um die beiden DNA-Stränge voneinander zu trennen, 2) einem Hybridisierungsschritt, in dem die beiden Primer an den jeweils komplementären Strang binden und 3) einem Syntheseschritt, während dessen der zwischen den Primern liegende DNA-Abschnitt mit Hilfe der DNA-Polymerase und der im Reaktionsmix vorhandenen Desoxyribonukleotide selektiv synthetisiert wird. Während jedes PCR-Zyklus sollte sich demnach die Menge der spezifischen DNA-Abschnitte verdoppeln, die im nächsten Zyklus wiederum als Template für die Amplifikationsreaktion dient. Theoretisch würde somit die Menge der Zielsequenz während der PCR-Reaktion exponentiell zunehmen. In der Praxis wird jedoch eine ca. 90-95 %ige Effizienz der PCR erreicht, da die Bedingungen für eine exponentielle Amplifizierung des Zielproduktes sowohl am Anfang wie auch am Ende der Reaktion nicht optimal sind. Eine typische PCR-Reaktion verläuft in den ersten Zyklen, bei denen die Templatemenge noch sehr gering ist, linear, steigt anschließend exponentiell an und erreicht in der letzten Phase der Reaktion ein Plateau, da die Enzymaktivität nach einer bestimmten Zeit nachlässt und auch die amplifizierten DNA-Abschnitte teilweise nicht mehr mit den Oligonukleotid-Primern, sondern untereinander hybridisieren. Aufgrund dieser PCR-Reaktionskinetik ist es schwierig, Aussagen über die Ausgangs-DNA-Mengen zu treffen. In vielen Fällen ist jedoch eine Quantifizierung der Ausgangstemplatemenge nötig. Dies führte zur Entwicklung von der Endpunktmessung zur "*real-time*" quantitative PCR. Bei dieser PCR-Variante wird ein fluoreszierender Reporterfarbstoff verwendet, um die Reaktion verfolgen zu können. Dieser Reporter kann von nicht-spezifischer Natur sein oder spezifisch mit der Ziel-DNA interagieren. In beiden Fällen steigt die Fluoreszenz proportional mit der Produktmenge an. "*Real-time*" Detektionssysteme bestehen im Prinzip aus einem PCR-Cycler sowie einem optischen Detektionsmodul, über das die mit der Produktzunahme ansteigenden Fluoreszenzwerte online nach jedem Zyklus gemessen werden. Die Auswertung und Quantifizierung erfolgt mittels der geeigneten Computersoftware. Die Fluorophore werden -je nach System- mit Halogen-, LED- oder Laserlicht angeregt.

3.2.4.17.4.1 Durchführung der RT-PCR nach dem Taqman-Prinzip

Beim TaqMan- oder auch 5'-Nuclease-Assay liegt zwischen den zwei spezifischen Oligonukleotid-Primern ein zusätzliches, fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid, die so genannte TaqMan-Sonde. Diese Sonde ist mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende und einem intern eingebauten oder am 3'-Ende liegenden Quencher markiert. Die Reporterfluoreszenzemission wird bei der intakten TaqMan-Sonde durch die Nähe zum Quencher unterdrückt. Bei der Neustrangsynthese schneidet die Taq-Polymerase durch ihre 5'-, 3'-Exonukleaseaktivität die TaqMan-Sonde in kleine Fragmente, wodurch es zu einer Loslösung des Reporters vom Quencher kommt und die Reporterfluoreszenz freigesetzt werden kann (Abb.22).

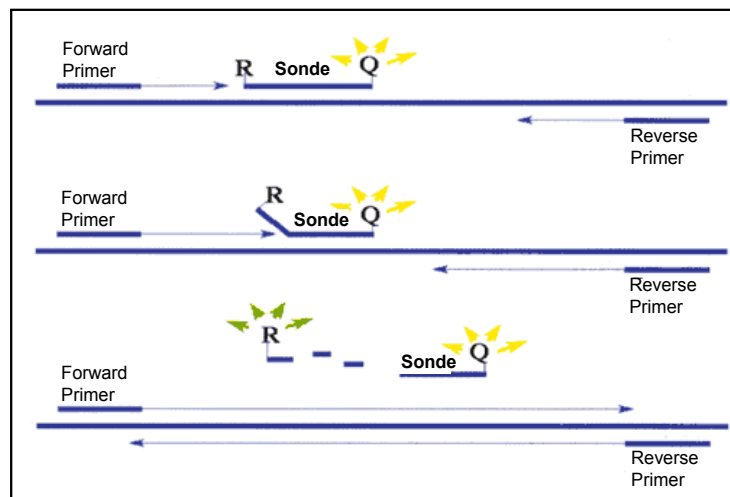


Abb. 22: Schematische Darstellung des TaqMan-Prinzips. Nach Abspaltung des Reporters (R) vom Quencher (Q) durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase wird die Reporterfluoreszenz messbar und zeigt die Synthese des spezifischen Zielstranges an. (Quelle: www.antibiotikamonitor.at/12_02/12_02_06.htm; www.pcr.at/html/mbicy.html#Aufbau%20).

Die Zunahme der Reporterfluoreszenz wird nach jedem Zyklus gemessen und ist wiederum proportional der Menge des DNA-Templates in dem Reaktionsgefäß. Die Taq-Polymerase fragmentiert nur die an die Zielsequenz gebundenen TaqMan-Sonden, nicht hybridisierte Einzelstränge bleiben unbeschadet. Mit Hilfe des TaqMan-Prinzips wurden hCG, TGF- β , IL-10 und foxp3 in den humanen Dezidua- und Plazentaprobe mittels RT-PCR analysiert. Zu der zu amplifizierenden cDNA (**1-3 μ l**) wurden jeweils **6,5 μ l** TaqMan-Mastermix, **3 μ l** Primermix, **0,5 μ l** TaqMan-Sonde und dH₂O bis zu einem Endvolumen von 13 μ l gegeben. Als Negativkontrolle (*No Template Control*, NTC) wurde eine Mi-

sung aus allen Reagenzien ohne die zu amplifizierende cDNA verwendet. Alle Proben wurden als Doppelbestimmungen ermittelt. Die RT-PCR wurde mit Hilfe eines ABI Prism®-Gerätes oder eines I-Cyclers durchgeführt.

PCR-Programm	T	T	Zyklenzahl
	95 °C	10 Minuten	1
Denaturierung	95 °C	15 Sekunden	
Annealing/ Amplifizierung	60 °C	60 Sekunden	40
	50 °C	60 Sekunden	1

3.2.4.17.4.2 Durchführung der RT-PCR unter Verwendung von SYBR-Green

SYBR®-Green verhält sich wie Ethidiumbromid als interkalierender Farbstoff, der sich unspezifisch in Doppelstrang-DNA einlagert (Abb.23(a)). Dadurch kommt es mit fortschreitender PCR-Reaktion zu einem Fluoreszenzanstieg. Der Vorteil von SYBR®-Green ist die universelle Verwendbarkeit, da es unspezifisch eingebaut wird und in jeder beliebigen PCR-Reaktion eingesetzt werden kann, sowie die hohe Signalstärke, da jedes DNA-Molekül mehrere Fluoreszenzmoleküle bindet. Darüber hinaus ist die Verwendung von SYBR®-Green im Vergleich zum Einsatz von spezifischen Sonden die kostengünstigere Variante. Es fehlt jedoch eine spezifische Bindung des Fluorophors an die zu amplifizierende Ziel-DNA, sodass eine Unterscheidung zwischen korrektem Produkt und Artefakt oder Primerdimeren, die während der PCR-Reaktion auch einen Fluoreszenzanstieg verursachen können, nicht möglich ist. Eine Differenzierung zwischen spezifischem Produkt und Primerdimeren sind im Anschluss an den PCR-Lauf mithilfe einer Schmelzkurvenanalyse möglich. Dabei kommt es durch schrittweisen Temperaturanstieg zu einer Auftrennung der DNA-Doppelstränge entsprechend ihrer jeweiligen Schmelzpunkte in ihre Einzelstränge. Die daraus resultierende Fluoreszenzabnahme wird aufgezeichnet. Aufgrund der Schmelztemperaturen kann man zwischen spezifischen Produkten und Primerdimeren unterscheiden, da Primerdimere bei geringeren Temperaturen schmelzen als die spezifischen, größeren PCR-Produkte (Abb.23(b)). Mittels SYBR®-Green wurde nrp-1 in den humanen Dezidua- und Plazentaproben analysiert.

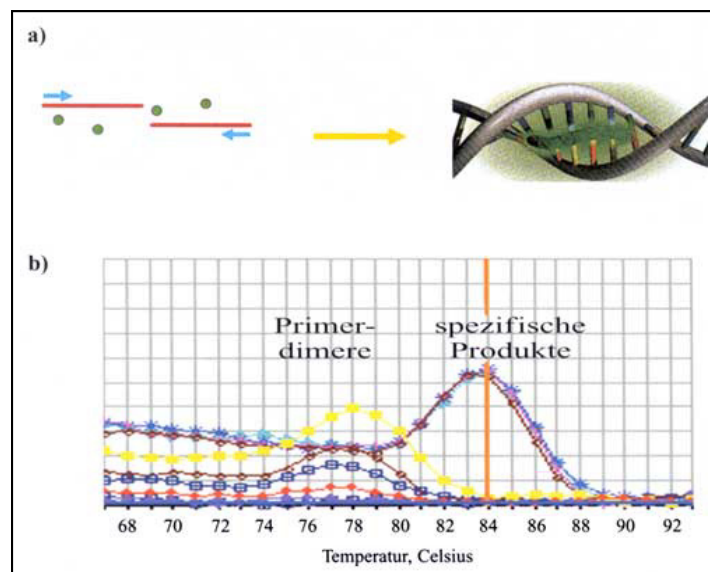


Abb. 23: SYBR-Green (SG)-Reaktion und Schmelzkurvenanalyse. Einbau von SG in doppelsträngige DNA (a) Unterscheidung der mit SG markierten PCR-Produkte mittels Schmelzkurvenanalyse (b) (Quelle: www.antibiotikamonitor.at/12_02/12_02_06.htm)

Zu **1 µl** der zu amplifizierenden cDNA wurden jeweils **6,25 µl** SYBR®-Green Mastermix, **3 µl** Primer-mix, **0,5 µl** Fluorescein und dH₂O bis zu einem Endvolumen von 13 µl gegeben. Als Negativkontrolle (*No Template Control*, NTC) wurde eine Mischung aus allen Reagenzien ohne die zu amplifizierende cDNA verwendet. Alle Proben wurden als Duplikate bestimmt. Die RT-PCR Analyse wurde mit Hilfe eines I-Cycler-Gerätes durchgeführt.

PCR-Programm	T	t	Zyklenzahl
Denaturierung Annealing Amplifizierung	95 °C	3 Minuten	1
	94 °C	30 Sekunden	45
	60 °C	30 Sekunden	
	72 °C	30 Sekunden	
	95 °C	60 Sekunden	1
Stop	4 °C	∞	1
Schmelzkurve	T	T	Zyklenzahl
	50 °C	1 Minute	1
	je 0,5 °C Anstieg in jedem Zyklus	10 Sekunden	80

3.2.4.17.4.3 Auswertung der RT-PCR

Die Quantifizierung der PCR basiert bei allen Systemen auf der Messung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem so genannten *Threshold Cycle* oder C_T -Wert. Der C_T -Wert ist jener PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz einen festgelegten Fluoreszenz-Schwellenwert übersteigt. Am Anfang der PCR-Reaktion wird nur die Basis- oder Hintergrundfluoreszenz gemessen, da die Reporterfluoreszenz aufgrund der geringen Templatekonzentration im Reaktionsgefäß während der ersten PCR-Zyklen normalerweise nicht detektierbar ist. Die Quantifizierung der DNA-Menge beruht nicht auf absoluten Mengen an PCR-Produkt, sondern auf der Kinetik der PCR-Reaktion. Dafür nimmt man als Richtlinie den C_T -Wert, da zu diesem Zeitpunkt die Amplifikation exponentiell ist und es in dieser Phase der PCR-Reaktion keine limitierenden Faktoren, wie Primer- oder Nukleotidmangel, nachlassende Enzymaktivität oder Inhibition der PCR-Reaktion durch Generation bestimmter Produkte gibt. Parallel dazu wird in jedem PCR-Lauf ein Haushaltsgen ("*house keeping gene*", β -Actin) mitamplifiziert, dessen Expression in jeder Probe gleich sein sollte. Es lässt sich im Folgenden aus den ermittelten C_T -Werten für das zu untersuchende Gen (Zielgen) und für das Haushaltsgen die Differenz (ΔC_T) bilden, die Aufschluss über die relative Expression des zu untersuchenden Gens zur Expression des Haushaltsgenes liefert. Die relative Expression des Zielgens kann dann zwischen den einzelnen Proben verglichen werden. Der ΔC_T -Wert berechnet sich nach folgender Formel:

$$\Delta C_T = \frac{(C_{T1} + C_{T2})_{\text{Zielgen}}}{2} - \frac{(C_{T1} + C_{T2})_{\text{Haushaltsgen}}}{2}$$

Aus dem ermittelten ΔC_T -Wert lässt sich die relative Expression des zu untersuchenden Gens berechnen:

$$\text{Expression} = 2^{-\Delta C_T}$$

Die berechneten Expressionswerte ließen sich anschließend mit Hilfe des Computerprogramms GraphPad Prism 5.0 graphisch darstellen und statistisch auswerten.

3.2.4.18 Statistik

Alle statistischen Berechnungen und graphischen Darstellungen wurden mit der Software GraphPad Prism 5.0 und SPSS Statistics 17.0 ausgeführt. Immunhistochemische und RT-PCR-Daten sind als Datenpunkte dargestellt, wobei jeder Datenpunkt einem Tier oder einer Probe entspricht. Die Daten

sind als Mediane dargestellt. Der statistische Unterschied zwischen allen Gruppen wurde mit Hilfe des Kruskal-Wallis Test ermittelt, wohingegen statistische Unterschiede zwischen zwei Gruppen mit Hilfe des nicht-parametrischen Mann Whitney *U*-Tests ermittelt wurden. Dieser Test prüft, ob zwei unabhängige Stichproben zu einer Grundgesamtheit gehören. Die Stichproben (Daten) müssen dabei keiner Normalverteilung folgen. Der Test ist demnach für schief verteilte und kleine Stichproben (geringe Anzahl an Tieren/Proben pro Stichprobe) gut geeignet. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ galt der Unterschied zwischen den beiden verglichenen Gruppen als statistisch signifikant. Die nicht-parametrische Spearman Korrelation wurde verwendet, um eine Korrelation zwischen RT-PCR Daten zweier verschiedener Gene zu analysieren. Parametrische Daten (z. B. Migrationsdaten) wurden mit dem Student's *t*-Test für den Vergleich zwischen zwei Gruppen und mit Two-Way-ANOVA für den Vergleich zwischen drei oder mehr Gruppen ausgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Versuchskomplex I: Untersuchungen zur Expansion der T_{reg}-Zellen vor der Schwangerschaft

4.1.1 Die Anzahl an T_{reg}-Zellen ist während der rezeptiven Phase des Estruszyklus erhöht

Der Menstrualzyklus beim Menschen und bei der Maus (Estruszyklus) ist durch starke Veränderungen im Hormonhaushalt gekennzeichnet. Hormone wie Progesteron, Östrogen und LH unterliegen während des Zyklus einem zyklischen Anstieg und Abfall. Im Maussystem konnte gezeigt werden, dass Östrogen in physiologischen Dosen nicht nur die Expansion von T_{reg}-Zellen fördert, sondern auch die Konversion von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in T_{reg}-Zellen bewirkt^[179]. Des Weiteren konnte ein Anstieg an T_{reg}-Zellen in der späten Follikularphase des Menstrualzyklus in nicht schwangeren Frauen beobachtet werden. Der Anstieg an T_{reg}-Zellen korrelierte mit den Mengen an Östradiol im Serum. Ein dramatischer Abfall an T_{reg}-Zellen erfolgte anschließend in der Lutealphase^[255]. Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass die während des Zyklus auftretenden Hormonschwankungen Veränderungen in der Anzahl an T_{reg}-Zellen hervorrufen. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit der prozentuale Anteil an T_{reg}-Zellen (Foxp3⁺ und CD4⁺Foxp3⁺) während der vier Stadien des Estruszyklus in jungfräulichen CBA/J-Weibchen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Untersuchungen wurden am Ort des ersten Kontaktes mit den väterlichen Antigenen (Vaginalflüssigkeit), in den lokalen Lymphknoten und direkt an der fetal-mütterlichen Grenzfläche (Uterus) vorgenommen. Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an Foxp3⁺- und CD4⁺Foxp3⁺-Zellen während des Estruszyklus in allen Organen zyklisch variierte (Abb.24 und Tab.5). Der Anteil an Foxp3⁺- und CD4⁺Foxp3⁺-Zellen stieg zum Estrus (rezeptive Phase) an, erreichte zu diesem Zeitpunkt ihren Höhepunkt und fiel anschließend im Metestrus wieder ab. Im Estrus ließen sich gegenüber dem Metestrus und Diestrus darüber hinaus signifikante Unterschiede in der Anzahl an Foxp3⁺- und CD4⁺Foxp3⁺-Zellen im Uterus feststellen (Abb.24).

Tab. 5: Der prozentuale Anteil an Foxp3⁺-Zellen war zum Zeitpunkt des Estrus in der Vaginalflüssigkeit, den lokalen Lymphknoten und im Uterus erhöht. Mittels Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Anteil an Foxp3⁺-Zellen bezogen auf die gesamte Lymphozytenpopulation in der Vaginalflüssigkeit, den lokalen Lymphknoten und im Uterus bestimmt. In der Vaginalflüssigkeit und im Uterus war die Anzahl an Foxp3⁺-Zellen im Estrus gegenüber dem Diestrus und Metestrus (Vaginalflüssigkeit) signifikant erhöht. Die Daten sind als Mediane^[Minimum/Maximum] dargestellt. Der paarweise Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney *U*-Test durchgeführt. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

	N	Foxp3 ⁺ -Zellen in der Vaginalflüssig- keit	N	Foxp3 ⁺ -Zellen in den Lymph- knoten	N	Foxp3 ⁺ -Zellen im Uterus
(1) Diestrus	8	0,94 ^[0,37/2,98]	5	2,90 ^[1,21/8,31]	5	15,62 ^[10,98/18,58]
(2) Proestrus	6	2,40 ^[0,30/3,28]	7	4,37 ^[4,17/6,47]	6	19,76 ^[11,96/41,79]
(3) Estrus	16	2,65 ^[0,74/5,97] *(zu 1), ***(zu 4)	6	4,74 ^[2,41/6,82]	6	21,45 ^[16,80/43,54] *(zu 1)
(4) Metestrus	11	1,44 ^[0,88/5,41]	5	3,90 ^[2,07/7,04]	5	19,92 ^[13,05/25,63]

Die Ergebnisse konnten klar zeigen, dass die Anzahl an T_{reg}-Zellen während des Estruszyklus zyklischen Veränderungen unterliegt. Antigen-spezifische T_{reg}-Zellen, die zum Zeitpunkt der rezeptiven Phase des Estruszyklus in erhöhter Anzahl vorliegen, können direkt nach der Insemination mit väterlichen Antigenen in Kontakt treten. Dies ermöglicht eine schnelle Expansion der gegen die väterlichen Antigene gerichteten schützenden T_{reg}-Zellen und kann als Vorbereitung auf eine bevorstehende Schwangerschaft angesehen werden.

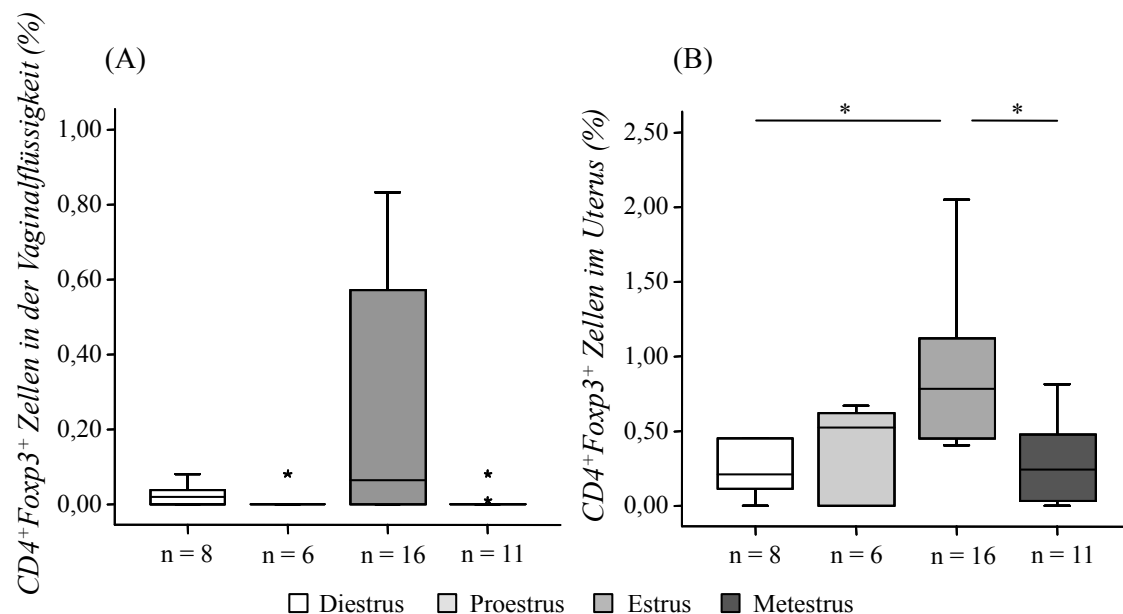


Abb. 24: Der Anteil an CD4⁺Foxp3⁺-Zellen war zum Zeitpunkt des Estrus in der Vaginalflüssigkeit und im Uterus erhöht. Mittels Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Anteil an CD4⁺Foxp3⁺-Zellen bezogen auf die gesamte Lymphozytenpopulation in der Vaginalflüssigkeit und im Uterus bestimmt. Im Uterus ließ sich eine signifikant erhöhte Anzahl an CD4⁺Foxp3⁺-Zellen im Estrus im Vergleich zum Diestrus und Metestrus feststellen (B). Entsprechende Daten konnten für die Vaginalflüssigkeit erhoben werden (A). Die Daten sind als Mediane mit Quartilen dargestellt. Der paarweise Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney U-Test durchgeführt. * = p < 0,05.

4.2 Versuchskomplex II: Untersuchungen zur Expansion der T_{reg}-Zellen während der frühen Schwangerschaft

4.2.1 Untersuchungen zur *in vivo* Expansion der T_{reg}-Zellen in der frühen Schwangerschaft

Vorangegangene Untersuchungen unserer und anderer Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass eine Expansion von T_{reg}-Zellen schon sehr früh in der Mausschwangerschaft sowohl systemisch in den lymphoiden Geweben als auch lokal im Uterus stattfindet^{[171][172][173]}. Darüber hinaus konnte ein Anstieg an T_{reg}-Zellen auch im Blut und der Dezidua in frühen Phasen der humanen Schwangerschaft nachgewiesen werden^[173]. Dagegen konnte eine reduzierte Anzahl an T_{reg}-Zellen sowohl in der humanen Schwangerschaft als auch in der Mausschwangerschaft mit Spontanaborten und Infertilität in Zusammenhang gebracht werden^{[136][162][172]}. Auf Grund der Bedeutung der T_{reg}-Zellexpansion für den

Schwangerschaftserfolg wurden in den letzten Jahren verschiedene Ansätze diskutiert, um die Schwangerschafts-bedingte Expansion der T_{reg} -Zellen zu erklären. Dennoch sind die genauen Faktoren und Mechanismen, die eine Expansion der T_{reg} -Zellen während der frühen Schwangerschaft bewirken, bis heute teilweise ungeklärt. Widersprüchliche Daten existieren zur Beteiligung von väterlichen Antigenen an der Expansion der T_{reg} -Zellen in der frühen Schwangerschaft^{[171][178]}. Unsere Arbeitsgruppe konnte mittels adoptiven Transfers von T_{reg} -Zellen nachweisen, dass der Anstieg an T_{reg} -Zellen in einer antigenspezifischen Art und Weise vermittelt wird^[136]. Mittels verschiedener Transferansätze konnte gezeigt werden, dass T_{reg} -Zellen aus normal schwangeren CBA/J-Weibchen (verpaart mit BALB/c-Männchen ($H2^d$)) in CBA/J-Abortweibchen (verpaart mit DBA/2J-Männchen ($H2^d$)) den Abort verhindern konnte, wohingegen der Transfer aus CBA/J-Weibchen einer „*third party*“-Kombination (verpaart mit CBA/J-Männchen ($H2^k$)) die Abortrate nicht senken konnte. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass nur T_{reg} -Zellen, die in der Verpaarung mit den BALB/c-Männchen spezifisch gegen das Hauptgewebeverträglichkeitsantigen $H2^d$ generiert wurden, die DBA/2J-Antigene des Feten schützen können^[136]. Des Weiteren konnte durch Verpaarung von Wildtypweibchen mit GFP-transgenen Männchen gezeigt werden, dass väterliche Zellen und Antigene (GFP⁺-Zellen oder -Zellbestandteile) in vielen Geweben des Weibchens schon vor der Implantation (Tag 0,5-5 der Schwangerschaft) vorzufinden sind^[49]. GFP⁺-Zellen oder -Zellbestandteile konnten direkt nach der Insemination (Tag 0,5 der Schwangerschaft) in der Vaginalflüssigkeit und in den Lymphknoten nachgewiesen werden und wiesen den Phänotyp von APZ (CD11c⁺MHCII⁺) auf^[49]. Daher ist eine Präsentation von väterlichen Antigenen gegenüber den T_{reg} -Zellen direkt nach Eintreten der Schwangerschaft möglich. Im weiteren Verlauf der Schwangerschaft tragen fetale Antigene der reifen Plazenta zur Aufrechterhaltung der T_{reg} -Zellen während der Schwangerschaft bei, indem Plazentazellen in den mütterlichen Blutkreislauf wandern und dort eine Expansion von T_{reg} -Zellen bewirken. Ausgehend von diesen Erkenntnissen kann vermutet werden, dass väterliche Antigene des Ejakulats für die Expansion der T_{reg} -Zellen während der frühen Schwangerschaft verantwortlich sind. Deshalb sollte in diesem Versuchsteil untersucht werden, ob und welche Bestandteile im Ejakulat zum Anstieg der T_{reg} -Zellen beitragen. Hierfür wurden CBA/J-Weibchen mit intakten, vasktomierten oder samenblasendefizienten BALB/c-Männchen verpaart und die Anzahl an T_{reg} -Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Samenblasendefiziente Männchen können auf Grund der fehlenden Samenblasenflüssigkeit kein Vaginalpfropf bilden. Eine bestehende Schwangerschaft wurde durch die Anwesenheit von Spermien in der Vaginalflüssigkeit und durch Messung der Progesteronkonzentration im Blutplasma bestätigt (Tab.9 im Anhang).

4.2.1.1 Das Vorhandensein von Spermien und Samenblasenflüssigkeit im Ejakulat ist essentiell für den Anstieg von T_{reg}-Zellen im Thymus

Als Bildungsstätte für die natürlich auftretenden T_{reg}-Zellen kommt dem Thymus während der Schwangerschaft für die Expansion der T_{reg}-Zellen eine entscheidende Bedeutung zu. Es konnte bereits ein Anstieg an T_{reg}-Zellen in der frühen Schwangerschaft im Thymus festgestellt werden^[173]. Für die Bestimmung, welche Bestandteile des Ejakulats für den Anstieg an T_{reg}-Zellen entscheidend sind, wurden CBA/J-Weibchen mit intakten (n=4-5/Tag), vasktomierten (n=4/Tag) oder samenblasendefizienten (n=5-6/Tag) BALB/c-Männchen verpaart. An den Schwangerschaftstagen 0,5; 2 oder 5 wurde der Thymus entnommen und die Anzahl an T_{reg}-Zellen (CD4⁺Foxp3⁺) ermittelt. Es konnte zunächst ein Anstieg der CD4⁺Foxp3⁺-Zellen im Thymus der schwangeren CBA/J-Weibchen (verpaart mit intakten Männchen) im Vergleich zu den nicht schwangeren CBA/J-Weibchen bestätigt werden (Abb.25). Dieser Anstieg war bei Weibchen, die mit vasktomierten oder samenblasendefizienten Männchen verpaart worden waren, signifikant (Tag 2 und 5 der Schwangerschaft) beeinträchtigt (Abb.25). Infolgedessen ist davon auszugehen, dass sowohl die Spermien als auch die Samenblasenflüssigkeit für die Expansion der T_{reg}-Zellen im Thymus essentiell sind.

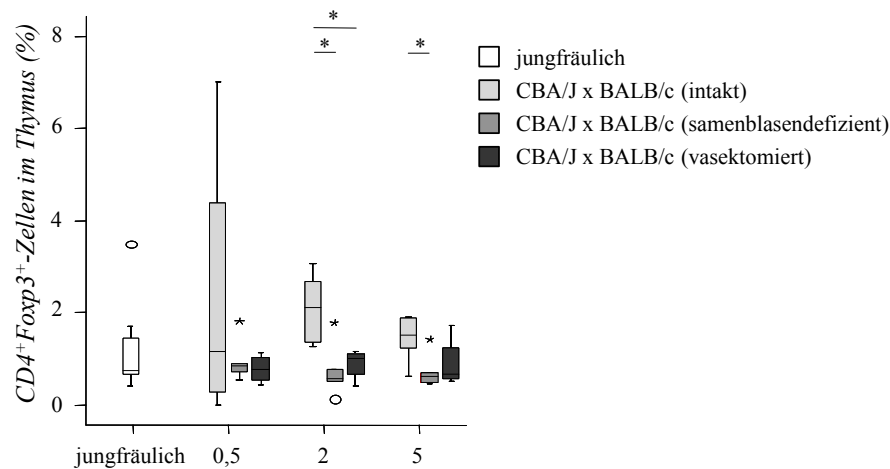


Abb. 25: Das Fehlen von Spermien oder Samenblasenflüssigkeit beeinträchtigte die Expansion der T_{reg} -Zellen *in vivo*. Mittels Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Anteil an $CD4^+Foxp3^+$ -Zellen bezogen auf die gesamte Lymphozytenpopulation im Thymus bestimmt. Die Expansion von $CD4^+Foxp3^+$ -Zellen im Thymus war in schwangeren CBA/J-Weibchen, die mit vasektomierten oder samenblasendefizienten BALB/c-Männchen verpaart wurden, im Vergleich zu schwangeren CBA/J-Weibchen, die mit intakten Männchen verpaart wurden, an den Tagen 2 und 5 der Schwangerschaft signifikant beeinträchtigt. Die Daten sind als Mediane mit Quartilen dargestellt. Der paarweise Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney *U*-Test durchgeführt. * = $p < 0,05$.

4.2.1.2 Das Vorhandensein der Samenblasenflüssigkeit, aber nicht der Spermien, ist entscheidend für den Anstieg der T_{reg} -Zellen in lokalen Lymphknoten

Das Auftreten von väterlichen Zellen und Zellbestandteilen in den lokalen Lymphknoten direkt nach der Insemination sowie der dort stattfindende gleichzeitige Anstieg an T_{reg} -Zellen lassen eine Expansion von antigenspezifischen T_{reg} -Zellen nach Erkennen von väterlichen Antigenen vermuten^{[49][173]}. Zur Bestimmung der Herkunft der väterlichen Antigene (Spermien und/oder Samenblasenflüssigkeit) wurden CBA/J-Weibchen mit intakten ($n=4-5/\text{Tag}$), vasektomierten ($n=4/\text{Tag}$) oder samenblasendefizienten ($n=5-6/\text{Tag}$) BALB/c-Männchen verpaart. An den Schwangerschaftstagen 0,5; 2 oder 5 wurden die paraaortischen Lymphknoten entnommen und die Anzahl an T_{reg} -Zellen ($CD4^+Foxp3^+$) mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Die Verpaarung der CBA/J-Weibchen mit intakten Männchen zeigte, dass $CD4^+Foxp3^+$ -Zellen bereits vor der Implantation in den lokalen Lymphknoten ansteigen (Abb.26). Dieser Anstieg ist wie im Thymus bei Verpaarung der Weibchen mit samenblasendefizienten Männchen signifikant beeinträchtigt (Tag 0,5 der Schwangerschaft). Allerdings konnte keine Beein-

trächtigung der Expansion von $CD4^{+}Foxp3^{+}$ -Zellen bei Verpaarung mit vasktomierten Männchen festgestellt werden (Abb.26). Somit ist davon auszugehen, dass für die Expansion der T_{reg} -Zellen in den paraaortischen Lymphknoten die Samenblasenflüssigkeit, jedoch nicht die Spermien erforderlich sind.

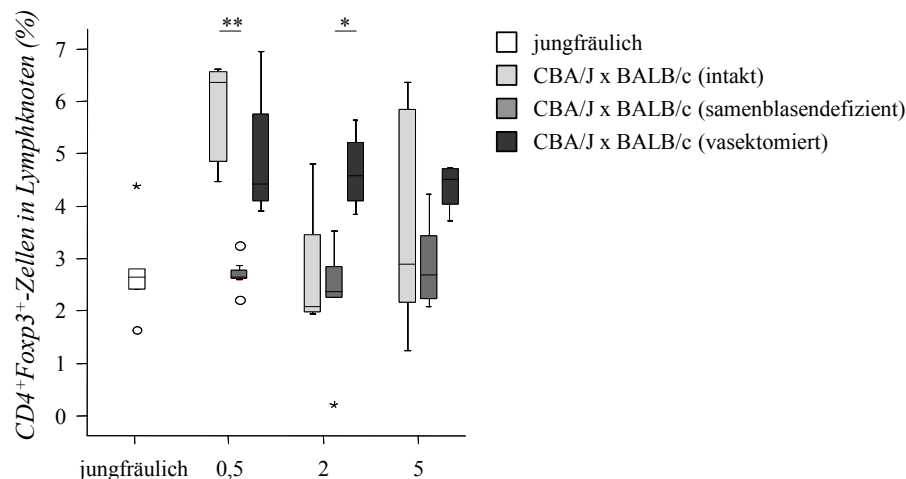


Abb. 26: Das Fehlen von Samenblasenflüssigkeit, jedoch nicht von Spermien beeinträchtigte die Expansion der T_{reg} -Zellen *in vivo*. Mittels Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Anteil an $CD4^{+}Foxp3^{+}$ -Zellen bezogen auf die gesamte Lymphozytenpopulation in den lokalen Lymphknoten bestimmt. Die Expansion von $CD4^{+}Foxp3^{+}$ -Zellen in paraaortischen Lymphknoten von schwangeren CBA/J-Weibchen erforderte die Anwesenheit der Samenblasenflüssigkeit, jedoch nicht die der Spermien im männlichen Ejakulat. Die Daten sind als Mediane mit Quartilen dargestellt. Der paarweise Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney *U*-Test durchgeführt. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Untersuchungen zur Anzahl an $CD4^{+}Foxp3^{+}$ -Zellen und $Foxp3^{+}$ -Zellen in Blut und Milz ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Verpaarungsgruppen. Ein Einfluss von Samenbestandteilen auf die Expansion von T_{reg} -Zellen in Blut und Milz konnte daher nicht nachgewiesen werden. (Tab.10 und 11 im Anhang).

4.2.2 Untersuchung zur Expansion der T_{reg} -Zellen nach *in vitro* Behandlung mit Samenblasenflüssigkeit

Die Verpaarung der CBA/J-Weibchen mit intakten oder samenblasendefizienten BALB/c-Männchen konnte zeigen, dass die Anwesenheit der Samenblasenflüssigkeit im männlichen Ejakulat essentiell für

die *in vivo* Expansion der T_{reg} -Zellen sowohl im Thymus als auch in den lokalen Lymphknoten ist. Zur Bestätigung der *in vivo* Ergebnisse und zur genaueren Analyse der für die Expansion verantwortlichen Faktoren in der Samenblasenflüssigkeit wurden aus CBA/J- oder BALB/c-Weibchen gewonnene T_{reg} -Zellen *in vitro* mit Samenblasenflüssigkeit von BALB/c- oder C57BL/6-Wildtypmännchen behandelt. Darüber hinaus wurde in diesem Versuchsteil auch der Einfluss der Samenblasenflüssigkeit und deren Bestandteile auf die Proliferation von $CD4^+CD25^-$ T-Zellen (Effektor T-Zellen, T_{eff}) untersucht. Die Proliferation der T_{reg} -Zellen und $CD4^+CD25^-$ T-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

4.2.2.1 Die Behandlung mit allogener Samenblasenflüssigkeit bewirkt eine Expansion der T_{reg} -Zellen, die durch Blockierung von TGF- β 1 gehemmt werden kann

T_{reg} -Zellen und $CD4^+CD25^-$ T-Zellen wurden aus einem Gemisch von Thymus und Milz aus jungfräulichen CBA/J-Weibchen isoliert und *in vitro* mit Samenblasenflüssigkeit (SBF) von BALB/c-Männchen (allogene Kombination) kultiviert. Die Proliferation beider Zellpopulationen wurde nach 24 und 48 Stunden mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Als ein Hauptbestandteil der SBF wurde das immunsuppressive Zytokin TGF- β 1 beschrieben^[256]. Dem Zytokin wurde bereits eine Rolle bei der Expansion von T_{reg} -Zellen zugeschrieben^{[134][257]}. Deshalb wurde in diesem Versuchsabschnitt zusätzlich untersucht inwieweit das in der SBF enthaltene TGF- β 1 einen Einfluss auf die Expansion der T_{reg} -Zellen hat. Die Zugabe eines anti-TGF- β 1 AK diente zur Blockierung des in der SBF enthaltenen TGF- β 1. Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe der SBF die Expansion der T_{reg} -Zellen, jedoch nicht die der Effektor T-Zellen begünstigt. Die Proliferation der T_{reg} -Zellen nach Zugabe der SBF war nach 48 Stunden im Vergleich zu unbehandelten T_{reg} -Zellen signifikant erhöht (Abb.27). Ein Unterschied zwischen den verschiedenen SBF-konzentrationen konnte nicht festgestellt werden. Darüber hinaus bewirkte die Blockierung von TGF- β 1 eine Hemmung der durch die SBF hervorgerufenen Expansion der T_{reg} -Zellen (Abb.27). Die *in vitro* gewonnenen Daten konnten den positiven Einfluss der SBF auf die T_{reg} -Zellexpansion bestätigen und hier insbesondere den des Zytokins TGF- β 1.

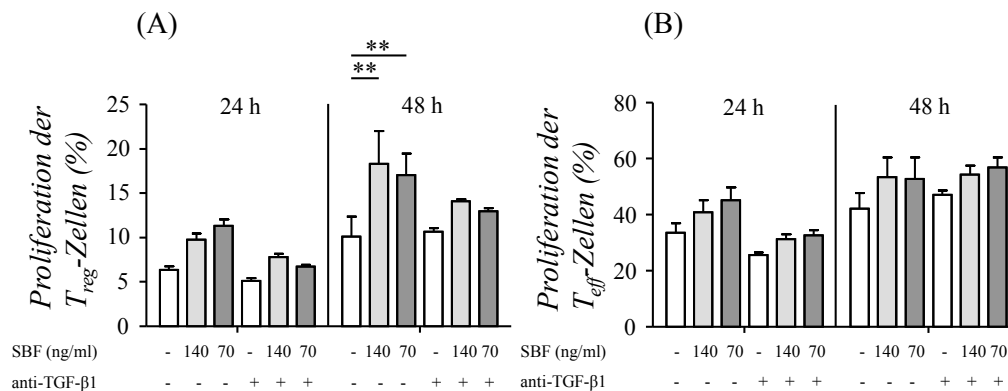


Abb. 27: Die Samenblasenflüssigkeit (SBF) bewirkte eine signifikante Expansion der T_{reg}-Zellen, jedoch nicht der Effektor T-Zellen. Beide Zelltypen wurden aus einem Gemisch aus Thymus und Milz isoliert und zur Ermittlung der Proliferationsrate mit dem Farbstoff CFDA-SE gefärbt. Der prozentuale Anteil an proliferierten Zellen bezogen auf die Gesamtzahl eingesetzter Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Zugabe allogener SBF von BALB/c-Männchen bewirkte die Proliferation von T_{reg}-Zellen (A), jedoch nicht die von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen (T_{eff}) (B) aus CBA/J-Weibchen. Die zusätzliche Blockierung von TGF-β1 konnte den beobachteten Effekt auf die T_{reg}-Zellen aufheben (A). Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Die Proliferationsassays wurden für jeden Zelltyp mindestens drei Mal mit Doppelbestimmungen durchgeführt. Der paarweise Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Student's *t*-Test durchgeführt. * = $p < 0,05$.

Ähnliche Ergebnisse konnten auch bei der Behandlung von T_{reg}-Zellen und Effektor T-Zellen aus einem Gemisch von Thymus und Milz aus BALB/c-Weibchen mit der SBF von C57BL/6-Wildtypmännchen erzielt werden (Tab.6). Hierbei bewirkte die Zugabe der SBF ebenfalls eine Expansion der T_{reg}-Zellen, die durch die Blockierung von TGF-β1 deutlich gehemmt werden konnte. Ein Einfluss der SBF auf die Proliferation der Effektor T-Zellen konnte nicht gezeigt werden (Tab.6).

Tab.6: Die Samenblasenflüssigkeit (SBF) bewirkte eine signifikante Expansion der T_{reg} -Zellen, jedoch nicht der Effektor T-Zellen. Beide Zelltypen wurden aus einem Gemisch aus Thymus und Milz isoliert und zur Ermittlung der Proliferationsrate mit dem Farbstoff CFDA-SE gefärbt. Der prozentuale Anteil an proliferierten Zellen bezogen auf die Gesamtzahl eingesetzter Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Zugabe von SBF von C57BL/6-Wildtypmännchen bewirkte eine Expansion der T_{reg} -Zellen, jedoch nicht der $CD4^+CD25^-$ Effektor T-Zellen (T_{eff}) aus BALB/c-Weibchen. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Die Proliferationsassays wurden für jeden Zelltyp mindestens drei Mal mit Doppelbestimmungen durchgeführt. Der paarweise Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Student's t -Test durchgeführt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Zeitpunkt	Zugabe von SBF [ng/ml]	Zugabe von anti-TGF- β 1	Proliferation der T_{reg} -Zellen (%)	Proliferation der T_{eff} -Zellen (%)
24 Stunden	-	-	5,32 \pm 3,96	15,54 \pm 3,73
24 Stunden	70	-	9,97 \pm 5,48	17,57 \pm 5,13
24 Stunden	140	-	7,56 \pm 5,35	15,31 \pm 3,55
24 Stunden	-	+	4,02 \pm 3,37	25,71 \pm 8,76
24 Stunden	70	+	4,46 \pm 2,77	28,67 \pm 10,59
24 Stunden	140	+	4,22 \pm 3,37	25,67 \pm 10,93
48 Stunden	-	-	10,31 \pm 8,61	27,49 \pm 9,4
48 Stunden	70	-	13,73 \pm 10,60	30,34 \pm 8,29
48 Stunden	140	-	13,40 \pm 11,56	30,87 \pm 6,93
48 Stunden	-	+	7,64 \pm 5,18	41,30 \pm 5,37
48 Stunden	70	+	8,06 \pm 4,17	44,98 \pm 7,59
48 Stunden	140	+	7,96 \pm 4,08	44,03 \pm 7,19

4.2.2.2 Die Behandlung mit syngener Samenblasenflüssigkeit hat keinen signifikanten Einfluss auf die Expansion der T_{reg} -Zellen

Im Jahr 2004 zeigten Aluvihare und Kollegen, dass die Anzahl an $CD4^+CD25^+$ T-Zellen in Weibchen syngener Verpaarungen vergleichbar zu der Anzahl an $CD4^+CD25^+$ T-Zellen in Weibchen allogener Verpaarungen im Verlauf der Schwangerschaft ansteigt. Die Autoren schlossen deshalb eine Alloanti-

gen-bedingte Expansion der T_{reg} -Zellen aus^[171]. Im Gegensatz dazu haben Arbeiten unserer und anderer Arbeitsgruppen gezeigt, dass die Anzahl an $CD4^+Foxp3^+$ -Zellen in allogenen Verpaarungen im Vergleich zu syngenesischen Verpaarungen erhöht ist^[173] (unveröffentlichte Beobachtungen von Ana Teles), was auf eine Alloantigen-getriebene Expansion der T_{reg} -Zellen hinweist. Widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Anzahl an T_{reg} -Zellen zwischen syngenesischen und allogenen Verpaarungen lassen sich möglicherweise auf die Analyse der verschiedenen Marker der T_{reg} -Zellen (CD25 oder Foxp3) zurückführen. Dennoch sind bis zum derzeitigen Zeitpunkt die Faktoren, welche die T_{reg} -Zellexpansion bedingen, noch ungeklärt. Bei einer Alloantigen-unabhängigen Expansion der T_{reg} -Zellen, die vorrangig durch TGF- β 1 bedingt wird, würde man eine Erhöhung der T_{reg} -Zellen auch in einer syngenesischen Verpaarung erwarten. Aus diesem Grund wurde in diesem Versuchsteil der Effekt der SBF von BALB/c-Männchen auf die Proliferation von genetisch identischen T_{reg} -Zellen und Effektor T-Zellen aus BALB/c-Weibchen getestet. Es konnte ein leichter Anstieg der T_{reg} -Zellen nach Behandlung mit syngener SBF im Vergleich zu den unbehandelten T_{reg} -Zellen nach 24 Stunden festgestellt werden (Abb.28). Der beobachtete Effekt war unabhängig von der eingesetzten Konzentration an SBF. Nach 48 Stunden Kultur waren Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten T_{reg} -Zellen jedoch kaum noch nachweisbar (Abb.28). Insgesamt betrachtet konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den behandelten T_{reg} -Zellen im Vergleich zu den unbehandelten T_{reg} -Zellen ermittelt werden. Ein Einfluss der SBF auf die Proliferation der Effektor T-Zellen war zu keinem Zeitpunkt nachweisbar (Abb.28).

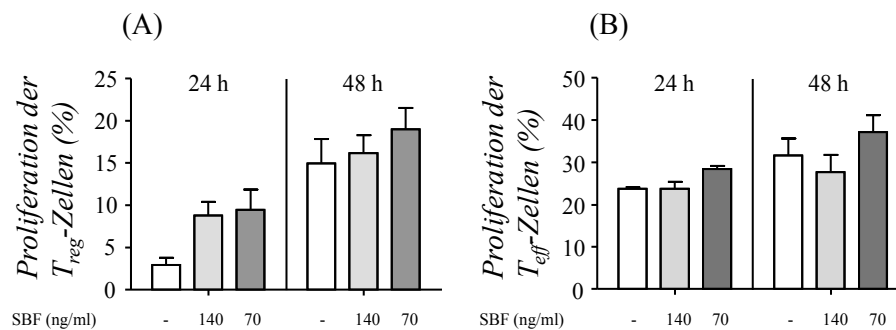


Abb. 28: Die Zugabe syngener Samenblasenflüssigkeit (SBF) hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Expansion der T_{reg}-Zellen und der Effektor T-Zellen. Beide Zelltypen wurden aus einem Gemisch aus Thymus und Milz isoliert und zur Ermittlung der Proliferationsrate mit dem Farbstoff CFDA-SE gefärbt. Der prozentuale Anteil an proliferierten Zellen bezogen auf die Gesamtzahl eingesetzter Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Zugabe syngener SBF von BALB/c-Männchen zu T_{reg}-Zellen und CD4⁺CD25⁻ Effektor T-Zellen (T_{eff}-Zellen) aus BALB/c-Weibchen zeigte nur einen leichten Anstieg der Proliferation der T_{reg}-Zellen (A) nach 24 Stunden, jedoch nicht der Effektor T-Zellen (B). Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Die Proliferationsassays wurden für jeden Zelltyp mindestens zwei Mal mit Doppelbestimmungen durchgeführt. Der paarweise Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Student's *t*-Test durchgeführt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede detektiert werden.

4.2.2.3 Die *in vitro* Behandlung mit rekombinantem TGF-β1 verursacht eine Expansion von T_{reg}-Zellen aus BALB/c-Weibchen, jedoch nicht aus CBA/J-Weibchen

Zur genaueren Analyse des Effektes von TGF-β1 auf die Expansion der T_{reg}-Zellen, wurden diese aus einem Gemisch von Thymus und Milz aus CBA/J- oder BALB/c-Weibchen mit rekombinantem TGF-β1 (rTGF-β1) behandelt. Die Zugabe von rTGF-β1 konnte die Proliferation der T_{reg}-Zellen aus BALB/c-Weibchen (n=4-6 für alle Zeitpunkte) nach 48 Stunden signifikant steigern (Abb.29). Die Hemmung des rTGF-β1 konnte den beobachteten Effekt vollständig neutralisieren (Abb.29).

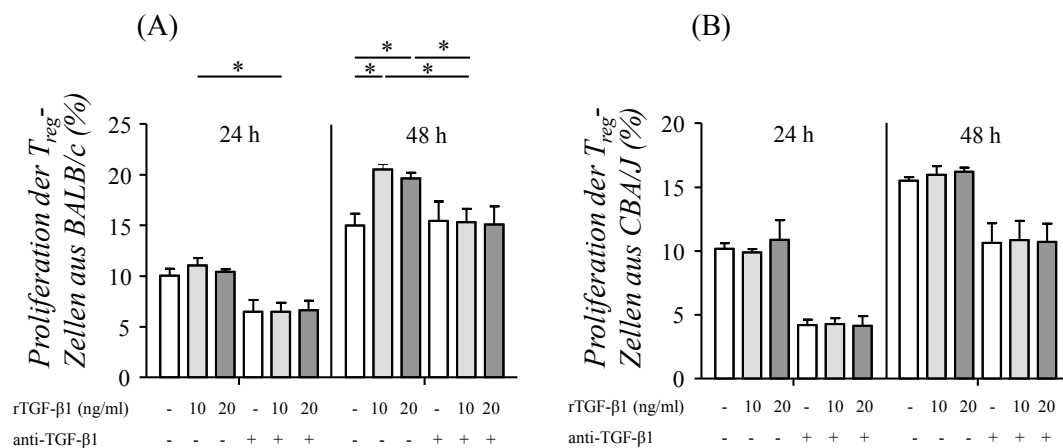


Abb. 29: Die Zugabe von rTGF-β1 hatte einen signifikanten Einfluss auf die Expansion der T_{reg}-Zellen aus BALB/c-Weibchen, jedoch nicht auf T_{reg}-Zellen aus CBA/J-Weibchen. Die T_{reg}-Zellen wurden aus einem Gemisch aus Thymus und Milz isoliert und zur Ermittlung der Proliferationsrate mit dem Farbstoff CFDA-SE gefärbt. Der prozentuale Anteil an proliferierten Zellen bezogen auf die Gesamtzahl eingesetzter Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Behandlung von T_{reg}-Zellen mit rTGF-β1 bewirkte einen signifikanten Anstieg der Proliferation der T_{reg}-Zellen aus BALB/c-Weibchen **(A)**, jedoch nicht der T_{reg}-Zellen aus CBA/J-Weibchen **(B)**. Der beobachtete Effekt des rTGF-β1 auf die T_{reg}-Zellen aus den BALB/c-Weibchen konnte durch Zugabe von anti-TGF-β1 neutralisiert werden **(A)**. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Die Proliferationsassays wurden mindestens drei Mal mit Doppelbestimmungen durchgeführt. Der paarweise Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Student's *t*-Test durchgeführt. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Im Gegensatz dazu konnte die Zugabe des rTGF-β1 zu den T_{reg}-Zellen aus CBA/J-Weibchen ($n=4$ für alle Zeitpunkte) keinen Effekt hervorrufen (Abb.29). Ein Einfluss von rTGF-β1 auf die Proliferation von Effektor T-Zellen konnte ebenfalls nicht gezeigt werden (Tab.7). Die gewonnenen Daten implizieren, dass TGF-β1 einen Einfluss auf die Expansion der T_{reg}-Zellen aus BALB/c-Weibchen, jedoch nicht auf T_{reg}-Zellen aus CBA/J-Weibchen hat.

Tab. 7: Die Zugabe von rTGF- β 1 hatte keinen Einfluss auf die Expansion der Effektor T-Zellen aus BALB/c- und CBA/J-Weibchen. Die CD4⁺CD25⁻ Effektor T-Zellen wurden aus einem Gemisch aus Thymus und Milz isoliert und zur Ermittlung der Proliferationsrate mit dem Farbstoff CFDA-SE gefärbt. Der prozentuale Anteil an proliferierten Zellen bezogen auf die Gesamtzahl eingesetzter Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Zugabe von rTGF- β 1 zu Effektor T-Zellen aus BALB/c- oder CBA/J-Weibchen hatte keinen Effekt auf die Proliferationsrate der Effektor T-Zellen. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Die Proliferationsassays wurden mindestens drei Mal mit Doppelbestimmungen durchgeführt. Der paarweise Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Student's *t*-Test durchgeführt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Zeitpunkt	Zugabe von rTGF- β 1 (ng/ml)	Zugabe von anti-TGF- β 1	Proliferation der T _{eff} aus BALB/c (%)	Proliferation der T _{eff} aus CBA/J (%)
24 Stunden	-	-	28,53±5,00	34,31±4,59
24 Stunden	10	-	28,65±5,24	33,08±2,84
24 Stunden	20	-	28,79±3,09	33,04±3,67
24 Stunden	-	+	32,31±10,49	31,12±1,03
24 Stunden	10	+	33,32±10,99	31,66±0,78
24 Stunden	20	+	31,75±12,07	30,50±1,69
48 Stunden	-	-	44,82±6,51	46,83±4,50
48 Stunden	10	-	42,91±8,88	48,61±3,61
48 Stunden	20	-	44,53±7,53	48,38±5,52
48 Stunden	-	+	46,59±10,08	52,14±2,64
48 Stunden	10	+	43,53±11,80	49,97±2,38
48 Stunden	20	+	44,45±13,10	50,17±1,05

4.3 Versuchskomplex III: Einfluss des Schwangerschaftshormons

Choriongonadotropin auf die Generierung, Migration und Funktion von T_{reg}-Zellen – Untersuchungen im Menschen

Es konnte bereits gezeigt werden, dass das Schwangerschaftshormon hCG für den erfolgreichen Schwangerschaftsverlauf unentbehrlich ist^{[258][259]}. Vor allem während der frühen Schwangerschaft übernimmt und vermittelt hCG wichtige schwangerschaftserhaltende und immunregulierende Funktionen^{[226][228][229][230][231][232][241][247][260]}. In diesem Zusammenhang konnte bereits ein Effekt des hCG auf verschiedene Zellen des Immunsystems gezeigt werden^{[226][240][241]}. Dennoch ist der Einfluss des hCG auf T_{reg}-Zellen noch weitgehend unbekannt. Infolgedessen wurde in diesem Versuchskomplex der Effekt des hCG auf die Entstehung, Migration und Funktion der T_{reg}-Zellen während der Schwangerschaft untersucht.

4.3.1 Untersuchung der fetal-mütterlichen Grenzfläche beim Menschen während der frühen Schwangerschaft

Zum besseren Verständnis der Untersuchungen an der fetal-mütterlichen Grenzfläche beim Menschen wurden von Gewebeproben (bestehend aus Plazenta und Dezidua) von normal schwangeren Frauen histologische Schnitte angefertigt und diese mit Hämatoxylin/Eosin (HE) gefärbt. Repräsentative Aufnahmen von der fetal-mütterlichen Grenzfläche sind in Abbildung 30 dargestellt. Abbildung 30(A) zeigt sowohl fetale Anteile (Chorionzotten) als auch mütterliche Anteile (Dezidua) von der fetal-mütterlichen Kontaktzone. Chorionzotten, die im direkten Kontakt mit dem Endometrium (Dezidua *basalis*) stehen, bezeichnet man als Haftzotten. Das Chorionepithel der Zotten setzt sich aus dem äußeren Synzytiotrophoblasten und dem inneren Zytotrophoblasten zusammen (Abb.30(B)). Der Synzytiotrophoblast ist durch eine große Zytoplasmamenge ohne Zellgrenzen charakterisiert, die eine große Anzahl an Zellkernen unterschiedlicher Größe enthält. Der Zytotrophoblast dagegen besteht aus einzelnen Zellen. Darüber hinaus enthalten die Chorionzotten Bindegewebe, Gefäße und einige Hofbauerzellen (Makrophagen).

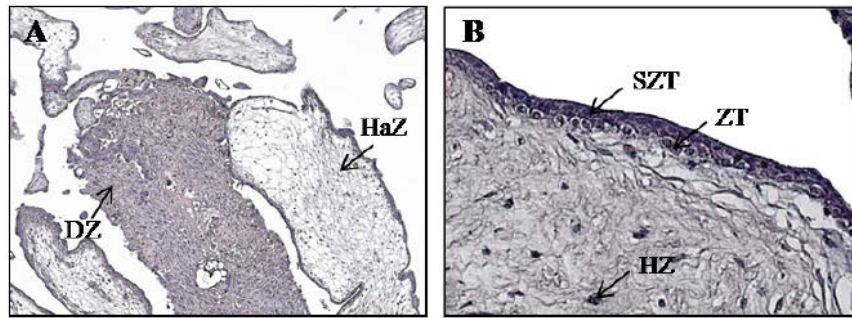


Abb. 30: Histologische Darstellung einer HE-Färbung von der fetal-mütterlichen Grenzfläche beim Menschen. **A** – zeigt den direkten Kontakt zwischen einer fetalen Chorionzotte (Haftzotte) und dem mütterlichen Endometrium (Dezidua *basalis*) (Vergrößerung: X100). **B** – zeigt eine Chorionzotte mit dem äußeren Synzytiotrophoblasten, dem inneren Zytotrophoblasten und einigen Hofbauerzellen im Lumen der Zotte. (Vergrößerung: X400) **DZ** – Deziduazelle, **HaZ** – Haftzotte, **SZT** – Synzytiotrophoblast, **ZT** – Zytotrophoblast, **HZ** - Hofbauerzelle

4.3.2 Die hCG mRNA-Expression ist in Gewebeproben von Patientinnen mit Spontanabort oder extrauteriner Schwangerschaft im Vergleich zu normal schwangeren Frauen in der frühen Schwangerschaft signifikant verringert

Zunächst wurde die Menge an hCG auf mRNA-Ebene in Gewebeproben bestehend aus Plazenta und Dezidua von normal schwangeren Frauen und Patientinnen mit Schwangerschaftskomplikationen untersucht, um die essentielle Rolle des hCG für die erfolgreich verlaufende Schwangerschaft zu bestätigen. Mittels RT-PCR wurde die hCG mRNA-Expression in Gewebeproben von Patientinnen mit Spontanabort oder extrauteriner Schwangerschaft sowie von Frauen mit normaler Schwangerschaft bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die hCG mRNA-Expression in Patientinnen mit Spontanabort oder extrauteriner Schwangerschaft im Vergleich zu normal schwangeren Frauen signifikant verringert ist (Abb.31). Darüber hinaus konnte im überwiegenden Teil der Gewebeproben der Patientinnen mit Schwangerschaftskomplikationen kaum oder gar kein hCG auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (Abb.31), was den Zusammenhang zwischen hCG und einer normalen Schwangerschaft unterstreicht.

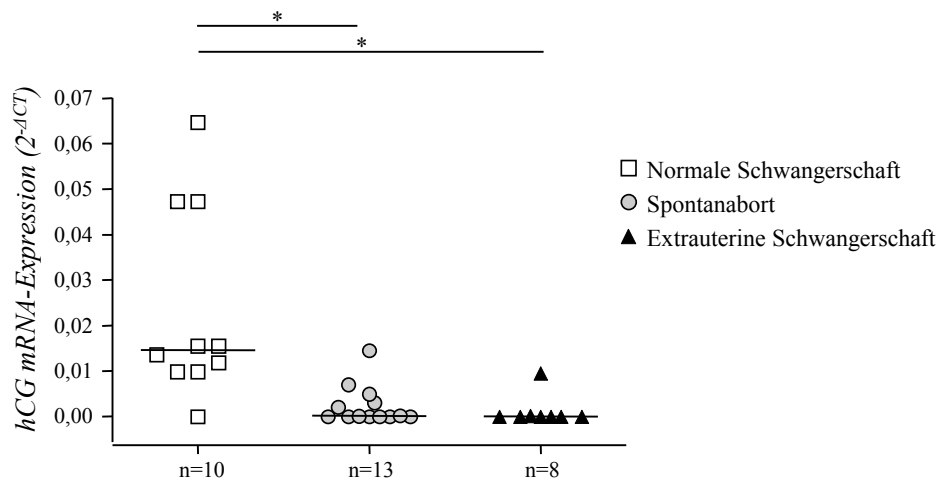


Abb. 31: Der Mangel an hCG mRNA an der fetal-mütterlichen Grenzfläche war mit dem Auftreten von Schwangerschaftskomplikationen assoziiert. Die hCG mRNA-Expression war in Gewebeproben bestehend aus Plazenta und Dezidua von Patientinnen mit Schwangerschaftskomplikationen im Vergleich zu Frauen mit normaler Schwangerschaft signifikant verringert. Kaum oder gar kein hCG konnte in Gewebeproben von Patientinnen mit Spontanabort oder extrauteriner Schwangerschaft auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Die Daten sind als Mediane dargestellt. Der paarweise Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney U-Test durchgeführt. * = $p < 0,05$.

4.3.3 Die hCG Proteinmenge ist in Gewebeproben von Patientinnen mit Spontanabort oder extrauteriner Schwangerschaft im Vergleich zu normal schwangeren Frauen signifikant vermindert

Zur Bestätigung der beobachteten Unterschiede auf mRNA-Ebene zwischen Patientinnen mit Schwangerschaftskomplikationen und normal schwangeren Frauen wurde die hCG-Proteinexpression in Gewebeschnitten aller drei Gruppen mittels Immunhistochemie analysiert. Zur Differenzierung zwischen den verschiedenen Deziduabereichen, Dezidua *basalis* oder Dezidua *parietalis*, wurden die Gewebeschnitte zunächst mit Zytokeratin gefärbt. Zytokeratinpositive Zytotrophoblasten wandern während der Implantation in das mütterliche Endometrium ein und kennzeichnen die Dezidua *basalis*, welche die direkte Kontaktzone zwischen mütterlichem und fetalem Gewebe darstellt. Außerhalb der Implantationszone befindet sich die Dezidua *parietalis*, welche keine zytokeratinpositiven Zytotrophoblastzellen enthält. Die Dezidua *basalis* lässt sich daher durch die rotbräunliche Färbung der eingewanderten Zytotrophoblasten von der Dezidua *parietalis* unterscheiden (Abb.32).

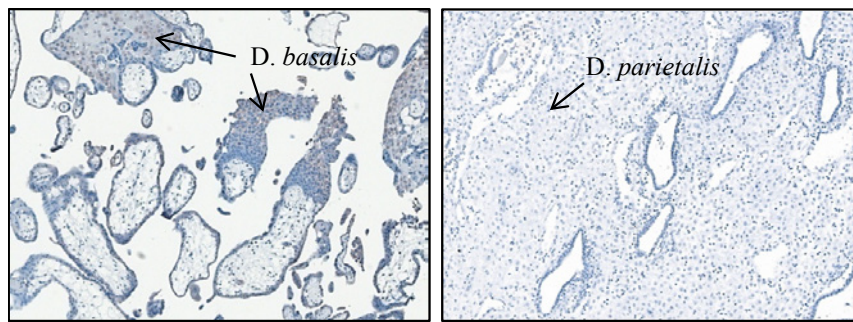


Abb. 32: Histologische Differenzierung zwischen Dezidua *basalis* und Dezidua *parietalis* an Hand einer Zytokeratinfärbung. Die Dezidua *basalis* ist durch eine rotbräunliche Färbung der eingewanderten Zytotrophoblastzellen gekennzeichnet, wohingegen die Dezidua *parietalis* auf Grund fehlender Zytotrophoblastzellen nicht gefärbt ist. **D** – Dezidua. Vergrößerung: X100.

Die sowohl fetale Zotten als auch mütterliche Dezidua enthaltenden Gewebeschnitte wurden gegen hCG gefärbt. Die semiquantitative Analyse der hCG-Färbeintensität konnte zeigen, dass Patientinnen mit Spontanabort oder extrauterinen Schwangerschaften nicht detektierbare oder nur geringe hCG-Proteinmengen aufwiesen. Im Gegensatz dazu zeigten normal schwangere Frauen eine sehr hohe Expression von hCG in den Deziduazellen der Dezidua *basalis*. Interessanterweise waren die hCG-Proteinmengen in der Dezidua *basalis* von Frauen mit Schwangerschaftskomplikationen im Vergleich zu normal schwangeren Frauen signifikant verringert (Abb.33). Daher ist zu vermuten, dass das von den Trophoblasten gebildete hCG aktiv die mütterlichen Immunantworten gegenüber dem Fetus in der Dezidua *basalis* moduliert und somit zur Akzeptanz des Feten beiträgt. In der Dezidua *parietalis* waren die hCG-Proteinlevel in Patientinnen mit Spontanabort gegenüber normal schwangeren Frauen nur leicht vermindert (Abb.33).

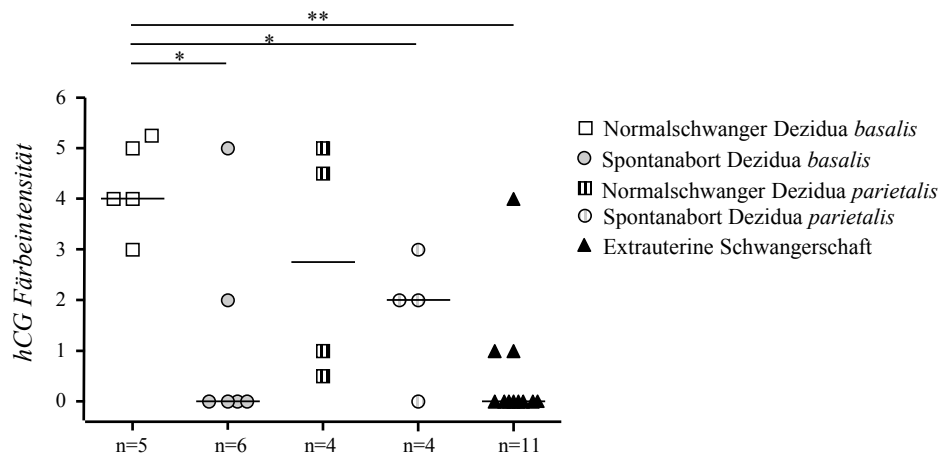


Abb. 33: Der Mangel an hCG-Protein in der Dezidua war mit dem Auftreten von Schwangerschaftskomplikationen assoziiert. Die hCG-Proteinmenge ist in Patientinnen mit Schwangerschaftskomplikationen im Vergleich zu normal schwangeren Frauen vermindert. Signifikante Unterschiede in der hCG-Expression zwischen Patientinnen mit Schwangerschaftskomplikationen und normal schwangeren Frauen ließen sich vor allem in der Dezidua *basalis* nachweisen. Die Auswertung der hCG-Proteinexpression erfolgte semiquantitativ auf Grundlage der Färbeintensität. Die Daten sind als Mediane dargestellt. Der paarweise Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney *U*-Test durchgeführt. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Abbildung 34 (A-D) zeigt repräsentative Aufnahmen der hCG-Färbung von Gewebeschnitten mit Dezidua *basalis* und Dezidua *parietalis* von Patientinnen mit Spontanabort und Frauen mit normaler Schwangerschaft. Die hCG-Färbeintensität (Intensität der Rot-Braunfärbung) ist in der Dezidua *basalis* von Patientinnen mit Spontanabort (B) gegenüber normal schwangeren Frauen (A) stark vermindert. Leichte Unterschiede in der Färbeintensität ließen sich auch in der Dezidua *parietalis* (D) versus C) erkennen. Des Weiteren war in den Gewebeschnitten der Patientinnen mit extrauteriner Schwangerschaft (E) wenig bis kein hCG nachweisbar.

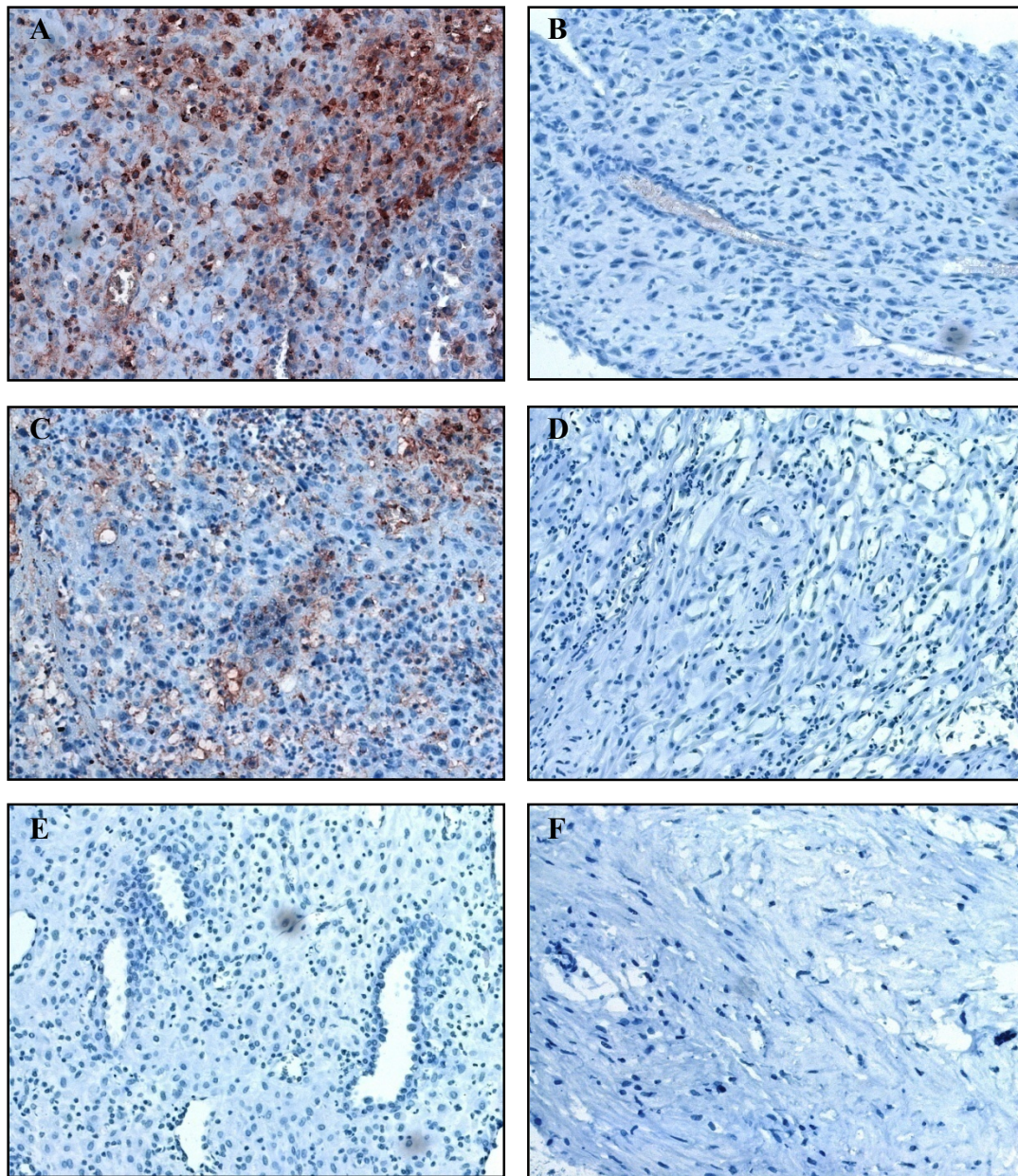


Abb. 34: Der Mangel an hCG-Protein in der Dezidua war mit dem Auftreten von Schwangerschaftskomplikationen assoziiert. Die hCG-Proteinmenge ist in der Dezidua *basalis* (A-B) und Dezidua *parietalis* (C-D) von Patientinnen mit Spontanabort im Vergleich zu normal schwangeren Frauen stark verringert. In den Gewebeschnitten von Patientinnen mit extrauteriner Schwangerschaft ließ sich kaum oder kein hCG nachweisen. A – Dezidua *basalis* (Normale Schwangerschaft), B – Dezidua *basalis* (Spontanabort), C – Dezidua *parietalis* (Normale Schwangerschaft), D – Dezidua *parietalis* (Spontanabort), E – extrauterine Schwangerschaft, F – Negativkontrolle. Vergrößerung: X200.

4.3.4 Patientinnen mit Spontanabort oder extrauteriner Schwangerschaft weisen verminderte Mengen an T_{reg}-Zellen im Vergleich zu normal schwangeren Frauen an der fetal-mütterlichen Grenzfläche auf

Um zu analysieren, ob eine hohe Expression von hCG mit einer erhöhten Anzahl an T_{reg}-Zellen an der fetal-mütterlichen Grenzfläche assoziiert ist, wurden in den zuvor auf die hCG-Expression untersuchten Proben die Expression der T_{reg}-Marker *foxp3* und *nrp-1* bestimmt. Beide Moleküle sind als Marker für T_{reg}-Zellen beschrieben worden^{[101][112]}, wobei *Foxp3* eine entscheidende Rolle für die Entwicklung und Funktion der T_{reg}-Zellen spielt. Im Mausabortmodell konnte bereits gezeigt werden, dass Abortmäuse weniger *foxp3* und *nrp-1* exprimieren als normal schwangere Mäuse^[94]. Diese Beobachtungen konnten hier für die menschliche Schwangerschaft bestätigt werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass Patientinnen mit Spontanabort oder extrauteriner Schwangerschaft signifikant weniger *foxp3* exprimieren als normal schwangere Frauen (Abb.35). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die *nrp-1*-Expression in Patientinnen mit Spontanabort im Vergleich zu normal schwangeren Frauen vermindert ist (Abb.35). Diese Daten lassen darauf schließen, dass eine reduzierte Anzahl an T_{reg}-Zellen und eine verringerte hCG-Expression an der fetal-mütterlichen Grenzfläche mit dem Auftreten von Schwangerschaftskomplikationen assoziiert sind.

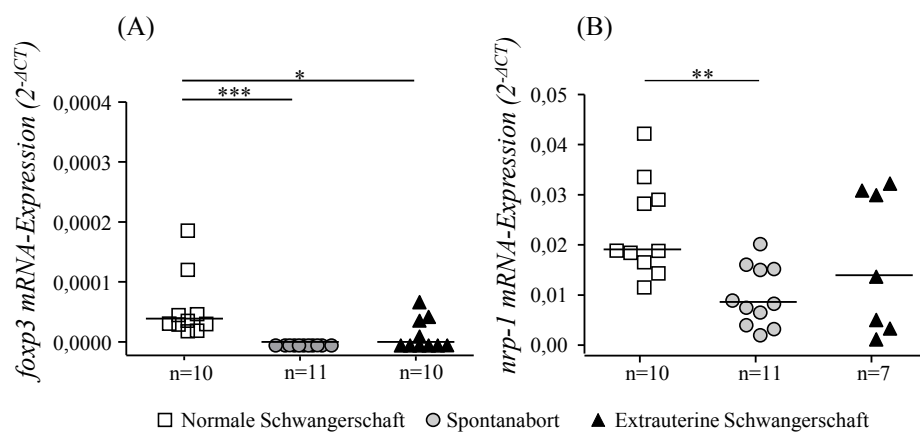


Abb. 35: Eine reduzierte Anzahl an T_{reg}-Zellen an der fetal-mütterlichen Grenzfläche war mit dem Auftreten von Schwangerschaftskomplikationen assoziiert. Die *foxp3*- (A) und neuropilin-1 (*nrp-1*) (B) mRNA-Expression ist in Patientinnen mit Spontanabort oder extrauteriner Schwangerschaft gegenüber normal schwangeren Frauen an der fetal-mütterlichen Grenzfläche signifikant vermindert. Die Daten sind als Mediane dargestellt. Der paarweise Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney *U*-Test durchgeführt. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

4.3.5 Die Expression von hCG korreliert mit der foxp3-Expression an der fetal-mütterlichen Grenzfläche

Die Analyse der hCG- und foxp3-Expression zeigte eine positive Korrelation zwischen beiden Molekülen an der fetal-mütterlichen Grenzfläche. Folglich konnte festgestellt werden, dass Patientinnen mit einer verringerten hCG-Expression auch weniger T_{reg}-Zellen aufweisen (Abb.36). Dieser Mangel an hCG und T_{reg}-Zellen an der fetal-mütterlichen Grenzfläche war mit dem Auftreten von Spontanaborten und extrauterinen Schwangerschaften assoziiert.

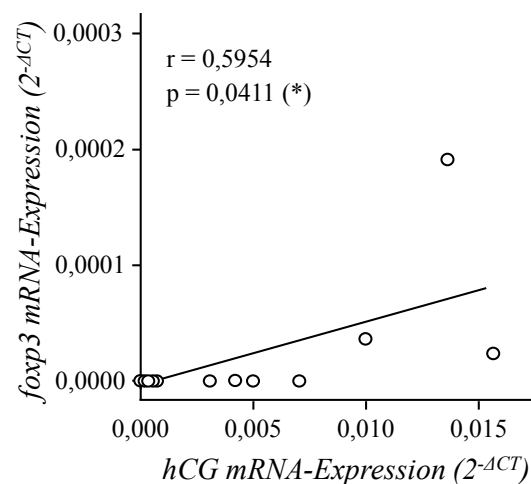


Abb. 36: Die hCG-Expression korrelierte mit der foxp3-Expression an der fetal-mütterlichen Grenzfläche. Mittels einer Spearman-Korrelations-Analyse konnte eine signifikant positive Korrelation zwischen der hCG- und foxp3 mRNA-Expression festgestellt werden. * = $p < 0,05$.

4.3.6 Die Funktion von T_{reg}-Zellen ist in Patientinnen mit Schwangerschaftskomplikationen im Vergleich zu normal schwangeren Frauen an der fetal-mütterlichen Grenzfläche beeinträchtigt

T_{reg}-Zellen vermitteln ihre suppressive Funktion entweder durch direkten Zell-Zell-Kontakt oder durch die Sekretion immunsuppressiver Zytokine wie IL-10 und TGF-β^{[105][106]}. Nachdem eine verminderte Anzahl an T_{reg}-Zellen in Patientinnen mit Schwangerschaftskomplikationen nachgewiesen wurde, sollte darüber hinaus geklärt werden, ob zudem eine Beeinträchtigung der Funktion der T_{reg}-Zellen bei diesen Patientinnen vorliegt. Eine direkte Untersuchung der Zytokinproduktion der T_{reg}-Zellen war auf Grund des Mangels an frischem Gewebe nicht möglich. Daher wurde die Expression von IL-10 und

TGF- β in schockgefrorenen Proben aus Plazenta- und Deziduagewebe von Patientinnen mit Spontanabort oder extrauteriner Schwangerschaft bestimmt und mit der Expression in normal schwangeren Frauen verglichen. Patientinnen mit Spontanabort oder extrauteriner Schwangerschaft wiesen eine signifikant geringere IL-10-Expression im Vergleich zu normal schwangeren Frauen auf (Abb.37). Die TGF- β -Expression war in Patientinnen mit Schwangerschaftskomplikationen gegenüber Frauen mit normalen Schwangerschaften verringert, jedoch nicht signifikant unterschiedlich (Abb.37). Die Ergebnisse zeigten, dass das Auftreten von Spontanaborten und extrauterinen Schwangerschaften sowohl mit einer verminderten Anzahl an T_{reg}-Zellen als auch mit einer möglicherweise beeinträchtigten Funktion dieser Zellen assoziiert ist.

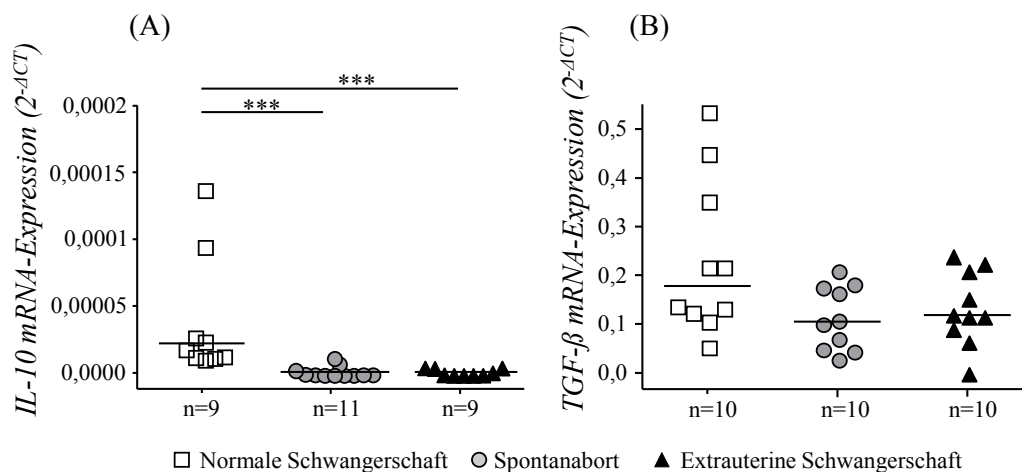


Abb. 37: Eine verminderte mRNA-Expression von IL-10 und TGF- β an der fetal-mütterlichen Grenzfläche war mit dem Auftreten von Schwangerschaftskomplikationen assoziiert. Die Expression von IL-10 (A) und TGF- β (B) war in Proben aus Plazenta- und Deziduagewebe von Patientinnen mit Spontanabort oder extrauteriner Schwangerschaft im Vergleich zu normal schwangeren Frauen signifikant (für IL-10) verringert. Die Daten sind als Mediane dargestellt. Der paarweise Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney U-Test durchgeführt. *** = $p < 0,001$.

4.3.7 Der LH/CG-Rezeptor ist auf T_{reg}-Zellen exprimiert

Nachdem erste Untersuchungen gezeigt haben, dass sowohl die Anzahl an T_{reg}-Zellen als auch die hCG-Expression an der fetal-mütterlichen Grenzfläche in Patientinnen mit Schwangerschaftskomplikationen im Vergleich zu normal schwangeren Frauen reduziert ist, konnte vermutet werden, dass hCG in die Chemoattraktion der T_{reg}-Zellen zur fetal-mütterlichen Grenzfläche involviert ist. In diesem

Versuchsteil wurde daher zunächst untersucht, ob T_{reg} -Zellen von normal schwangeren Frauen den LH/CG-Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren und somit für eine Chemoattraktion durch hCG empfänglich sind. Hierfür wurden T_{reg} -Zellen aus dem Blut von normal schwangeren Frauen isoliert und für 24 Stunden mit hCG-produzierenden Choriokarzinomzellen (JEG-3) kokultiviert. Die Expression des LH/CG-Rezeptors auf den T_{reg} -Zellen wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz analysiert. Die durchflusszytometrische Analyse konnte zeigen, dass der LH/CG-Rezeptor von mindestens 25 % der T_{reg} -Zellen aus dem peripheren Blut von normal schwangeren Frauen exprimiert wird. (Abb.38).

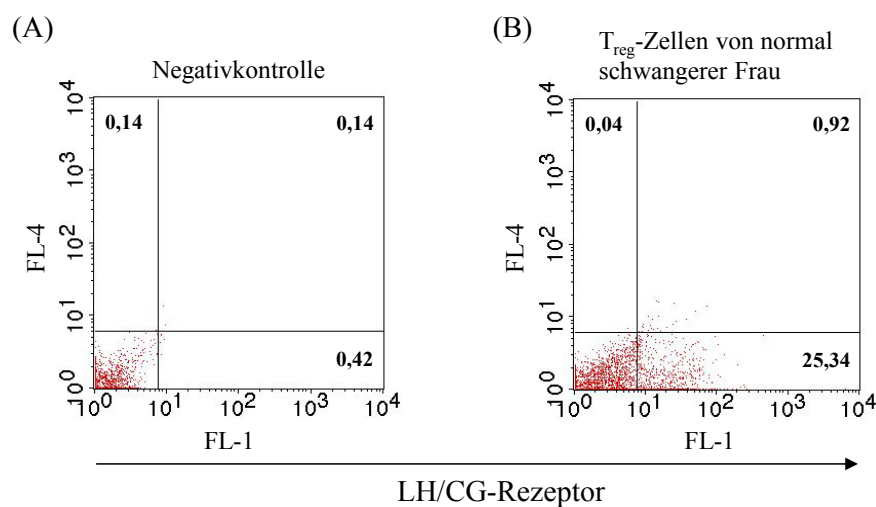


Abb. 38: T_{reg} -Zellen aus normal schwangeren Frauen exprimierten den LH/CG-Rezeptor. Mittels Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Anteil an LH/CG-Rezeptor positiven T_{reg} -Zellen bezogen auf die gesamte Anzahl an T_{reg} -Zellen bestimmt. Der Nachweis des LH/CG-Rezeptors erfolgte über ein Fluoreszenzsignal im Fluoreszenzkanal 1 (FL1), da der Rezeptor mit einem FITC-gekoppelten AK markiert wurde. Die Expression des LH/CG-Rezeptors konnte auf mindestens 25 % der T_{reg} -Zellen von normal schwangeren Frauen nach Kokultivierung mit JEG-3-Zellen nachgewiesen werden. Dargestellt ist ein repräsentativer Dot Plot der LH/CG-Rezeptorfärbung (B). T_{reg} -Zellen, die nicht mit dem anti-LH/CG-Rezeptor AK behandelt wurden, dienten als Negativkontrolle (A). FL1, FL4 – Fluoreszenzkanal 1 bzw. 4

Um eine Aussage über die Verteilung des LH/CG-Rezeptors auf der Oberfläche der T_{reg} -Zellen treffen zu können, wurden zusätzlich Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Hierfür wurden die T_{reg} -Zellen gleichzeitig mit dem Zellkernfarbstoff DAPI gefärbt, um eine Betrachtung auf der Einzelzebene zu ermöglichen (Abb.39(A)). FITC-gefärbte LH/CG-Rezeptormoleküle ließen sich als „grüne“ Punkte auf den T_{reg} -Zellen darstellen (Abb.39(B)). Durch Übereinanderlegen beider Färbungen konn-

ten mehrere Rezeptormoleküle auf einer T_{reg} -Zelle nachgewiesen werden (Abb.39(C)). Daher ist eine durch hCG-vermittelte Chemoattraktion der T_{reg} -Zellen zur fetal-mütterlichen Grenzfläche möglich.

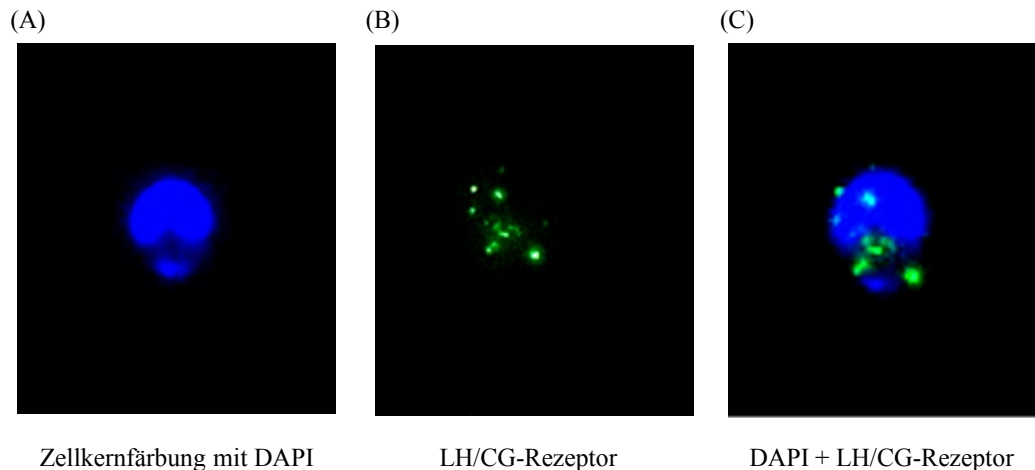


Abb. 39: Mehrere LH/CG-Rezeptormoleküle wurden von einer T_{reg} -Zelle exprimiert. Mittels einer Immunfluoreszenzfärbung konnten mehrere LH/CG-Rezeptormoleküle auf der Oberfläche einer T_{reg} -Zelle nachgewiesen werden. Die Aufnahmen zeigen T_{reg} -Zellen, die gegen ihre Zellkerne (A) und den LH/CG-Rezeptor (B) gefärbt wurden. Aufnahme (C) zeigt eine Überlagerung der Aufnahmen (A) und (B). Vergrößerung: X400.

4.3.8 HCG-produzierende Primärtrophoblasten und JEG-3-Zellen bewirken die Migration von T_{reg} -Zellen

Nachdem die Empfänglichkeit der T_{reg} -Zellen für eine hCG-vermittelte Chemoattraktion durch Expression des LH/CG-Rezeptors bestätigt werden konnte, wurde unter Verwendung eines Transwell-Systems die Migration der T_{reg} -Zellen zu hCG-produzierenden und nicht-hCG-produzierenden Zellen untersucht (siehe Tab.12 im Anhang). Hierfür wurden aus normal schwangeren Frauen des ersten und dritten Schwangerschaftstrimesters T_{reg} -Zellen isoliert und zunächst mit hCG-produzierenden JEG-3-Zellen im Transwell-System kokultiviert. Die Migration der T_{reg} -Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Gesamtzahl an migrierten T_{reg} -Zellen nach Abzug der Spontanmigration wurde zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt. Eine effiziente Migration der T_{reg} -Zellen zu den hCG-produzierenden JEG-3-Zellen konnte gezeigt werden. Dabei nahm die Anzahl an totalen migrierten T_{reg} -Zellen über die Zeit hinweg signifikant zu (Abb.40).

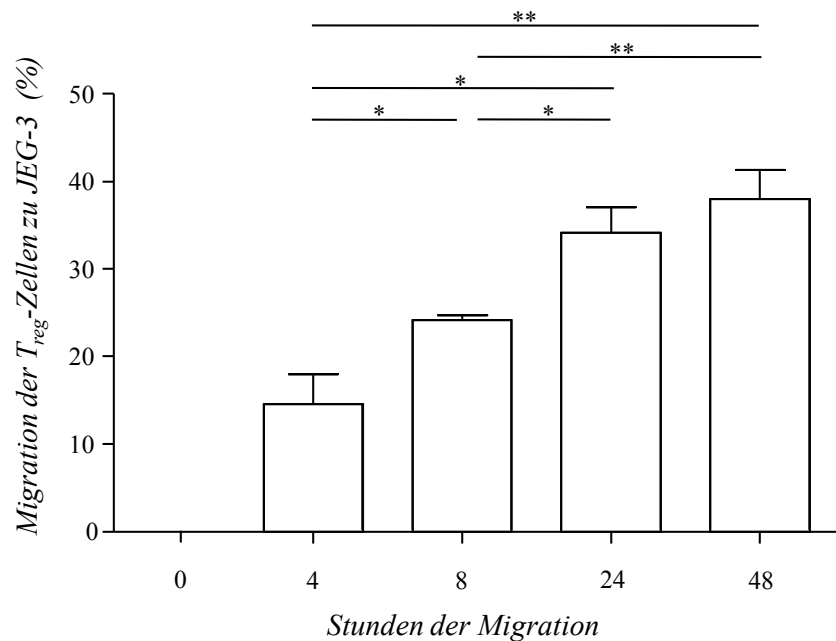


Abb. 40: HCG-produzierende JEG-3-Zellen bewirkten eine effiziente Migration der T_{reg}-Zellen. Unter Verwendung eines 2-Kammer-Transwell-Systems wurde die Migration von T_{reg}-Zellen aus normal schwangeren Frauen (n=4) zu JEG-3-Zellen untersucht. Die Ermittlung des prozentualen Anteils an migrierten T_{reg}-Zellen bezogen auf die Gesamtzahl eingesetzter T_{reg}-Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die Migration der T_{reg}-Zellen zu den JEG-3-Zellen nahm signifikant über die Zeit hinweg zu. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Der paarweise Vergleich zwischen den einzelnen Zeitpunkten wurde mit dem Student's *t*-Test durchgeführt. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$.

Um zu überprüfen, ob die beobachtete Migration der T_{reg}-Zellen zu den JEG-3-Zellen auch der physiologischen Situation während der Schwangerschaft entspricht, wurde in einem nächsten Schritt die Migration der T_{reg}-Zellen zu Primären Trophoblasten analysiert. Die Trophoblasten wurden hierfür direkt aus der Plazenta von normal schwangeren Frauen isoliert. Entsprechend dem Migrationsverhalten der T_{reg}-Zellen gegenüber den JEG-3-Zellen konnte auch bei Verwendung von Primären Trophoblasten eine effiziente Migration nachgewiesen werden (Abb.41). Die Migration der T_{reg}-Zellen nahm über die Zeit hinweg signifikant zu. Diese Daten legen eine hCG-vermittelte Migration der T_{reg}-Zellen zur fetal-mütterlichen Grenzfläche in der Schwangerschaft nahe.

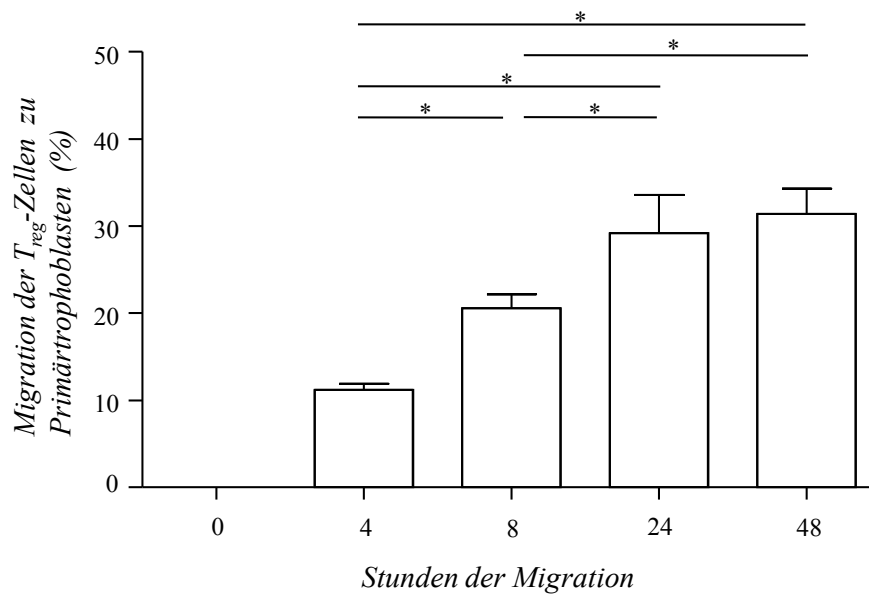


Abb. 41: HCG-produzierende Primärtrophoblasten bewirkten eine effiziente Migration der T_{reg}-Zellen.

Unter Verwendung eines 2-Kammer-Transwell-Systems wurde die Migration von T_{reg}-Zellen aus normal schwangeren Frauen (n=4) zu Primärtrophoblasten untersucht. Die Ermittlung des prozentualen Anteils an migrierten T_{reg}-Zellen bezogen auf die Gesamtzahl eingesetzter T_{reg}-Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die Migration der T_{reg}-Zellen zu den Primärtrophoblasten nahm signifikant über die Zeit hinweg zu. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Der paarweise Vergleich zwischen den einzelnen Zeitpunkten wurde mit dem Student's *t*-Test durchgeführt. * = *p* < 0,05.

In einem weiteren Experiment wurde die *ex vivo* Interaktion zwischen T_{reg}-Zellen und Trophoblasten untersucht. Hierfür wurden isolierte T_{reg}-Zellen und JEG-3-Zellen in einer 3D-Kollagenmatrix, welche einer echten extrazellulären Matrix entspricht, kokultiviert^[261]. Mittels Aufnahmen im Zeitraffer konnte gezeigt werden, dass T_{reg}-Zellen aktiv zu JEG-3-Zellen migrierten und mehrfach mit ihnen in Kontakt traten. (Abb.42). Folglich migrieren T_{reg}-Zellen nicht nur aktiv zur fetal-mütterlichen Grenzfläche, sondern interagieren auch direkt vor Ort mit den Trophoblastzellen.

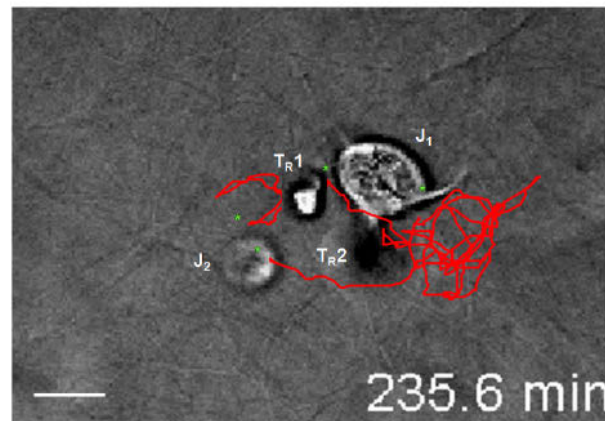


Abb. 42: T_{reg} -Zellen migrierten aktiv zu JEG-3-Zellen und traten mehrfach in Kontakt mit ihnen. Mittels eines 3D-Kollagenmatrix-Assays wurde die Migration von T_{reg} -Zellen aus normal schwangeren Frauen zu JEG-3-Zellen untersucht. Die Abbildung stellt den Migrationsweg (rote Linie) einer einzelnen T_{reg} -Zelle (T_R) dar, welche mit zwei verschiedenen JEG-3-Zellen (J_1 und J_2) mehrfach interagierte. Die Zellbewegungen wurden mittels Aufnahmen im Zeitraffer dokumentiert. T_{R1} – Startpunkt der T_{reg} -Zellmigration; T_{R2} – Endpunkt der T_{reg} -Zellmigration

4.3.9 Transiente hCG-Expression von HCT116-Zellen begünstigt die Migration der T_{reg} -Zellen

Zur Bestätigung einer hCG-vermittelten Migration der T_{reg} -Zellen sowie zur genauen Aufklärung des Einflusses verschiedener Untereinheiten des hCG auf die Migration, wurden nicht-hCG-produzierende Darmkrebszellen mit verschiedenen hCG-Untereinheiten transfiziert und die Migration der T_{reg} -Zellen analysiert. Die Transfektion der Darmkrebszelllinie HCT116 mit der α -Untereinheit sowie zwei verschiedenen β -Untereinheiten (hCG- $\beta 3$ und hCG- $\beta 7$) wurde in Kooperation mit Leipzig durchgeführt. Der hCG-Gehalt im Zellkulturüberstand transfizierter Zellen betrug in Abhängigkeit vom Experiment 500-2800 IU/L. Im Vergleich dazu konnte im Zellkulturüberstand nicht-transfizierter HCT116-Zellen kein hCG nachgewiesen werden. In einem ersten Versuch wurde die Migration der T_{reg} -Zellen zu den HCT116-Zellen bestimmt, welche mit dem vollständigen hCG-Molekül (α - und β -Untereinheit) transfiziert worden waren. Die Analyse der Zellmigration zeigte nach 24 Stunden einen signifikanten Unterschied zwischen hCG-transfizierten HCT116-Zellen und den Kontroll-transfizierten HCT116-Zellen (Abb.43). Keine signifikanten Unterschiede ließen sich zwischen den verschiedenen hCG- β -Untereinheiten feststellen.

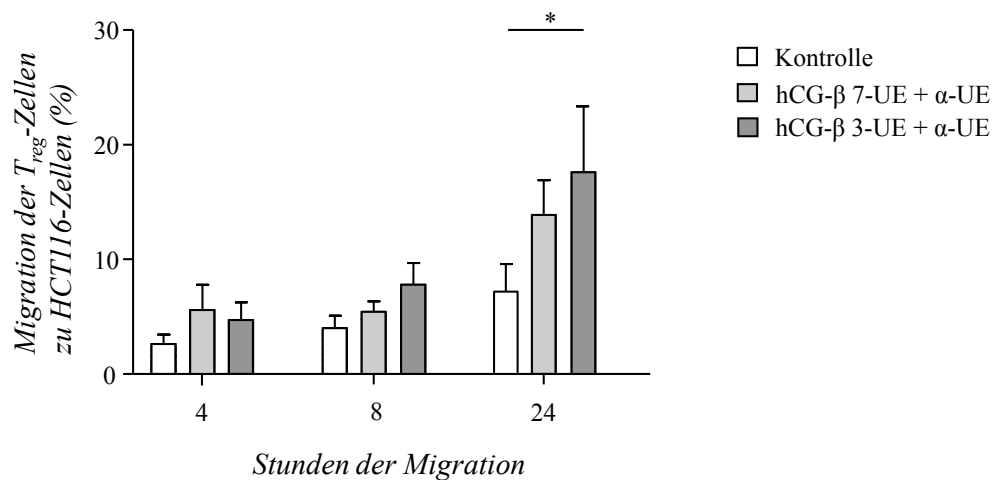


Abb. 43: HCG-transfizierte HCT116-Zellen begünstigten die Migration von T_{reg} -Zellen. Unter Verwendung eines 2-Kammer-Transwell-Systems wurde die Migration von T_{reg} -Zellen aus normal schwangeren Frauen ($n=3$) zu hCG-transfizierten oder Kontroll-transfizierten Darmkrebszellen (HCT116) untersucht. Die Ermittlung des prozentualen Anteils an migrierten T_{reg} -Zellen bezogen auf die Gesamtzahl eingesetzter T_{reg} -Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die transiente Expression des vollständigen hCG-Moleküls förderte die Migration der T_{reg} -Zellen. Signifikante Unterschiede ließen sich nach 24 Stunden zwischen den hCG-transfizierten und den Kontroll-transfizierten HCT116-Zellen feststellen. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Der paarweise Vergleich zwischen den unterschiedlich transfizierten HCT116-Zellen wurde mit dem Student's t -Test durchgeführt. * = $p < 0,05$. UE – Untereinheit.

In einem zweiten Experiment wurde analysiert inwieweit die hCG-Untereinheiten alleine ausreichend sind, um eine Migration der T_{reg} -Zellen zu bewirken. Hierfür wurden HCT116-Zellen entweder nur mit der α -Untereinheit oder mit zwei verschiedenen β -Untereinheiten transfiziert. Die Auswertung der Migration zeigte eine signifikant stärkere Migration der T_{reg} -Zellen zu den hCG-transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontroll-transfizierten Zellen. Dabei war die Migration der T_{reg} -Zellen zu den mit der α -Untereinheit transfizierten Darmkrebszellen am stärksten ausgeprägt (Abb.44). Keine signifikanten Unterschiede konnten zwischen den beiden verschiedenen β -Untereinheiten festgestellt werden (Abb.44). Die Ergebnisse haben gezeigt, dass neben dem vollständigen hCG-Molekül auch die einzelnen hCG-Untereinheiten alleine das Potential haben T_{reg} -Zellen anzulocken.

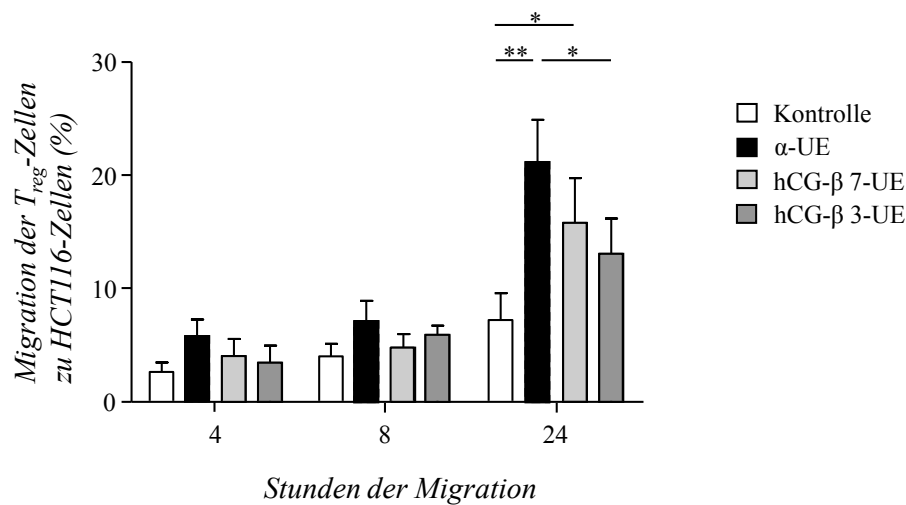


Abb. 44: HCG-transfizierte HCT116-Zellen begünstigten die Migration von T_{reg} -Zellen. Unter Verwendung eines 2-Kammer-Transwell-Systems wurde die Migration von T_{reg} -Zellen aus normal schwangeren Frauen ($n=3$) zu hCG-transfizierten oder Kontroll-transfizierten Darmkrebszellen (HCT116) untersucht. Die Ermittlung des prozentualen Anteils an migrierten T_{reg} -Zellen bezogen auf die Gesamtzahl eingesetzter T_{reg} -Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die transiente Expression der einzelnen hCG-Untereinheiten förderte die Migration von T_{reg} -Zellen. Signifikante Unterschiede ließen sich nach 24 Stunden zwischen den hCG-transfizierten und den Kontroll-transfizierten HCT116-Zellen feststellen. Die Migration der T_{reg} -Zellen gegenüber den mit der α -UE transfizierten HCT116-Zellen war am stärksten ausgeprägt. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Der paarweise Vergleich zwischen den unterschiedlich transfizierten HCT116-Zellen wurde mit dem Student's t -Test durchgeführt. * = $p < 0,05$. UE – Untereinheit.

Die Ergebnisse konnten deutlich zeigen, dass das vom Trophoblasten sezernierte hCG neben weiteren Faktoren, die Migration der T_{reg} -Zellen zur fetal-mütterlichen Grenzfläche begünstigt.

4.3.10 Die nicht-hCG-produzierende Keratinozytzelllinie HaCat ist nicht in der Lage T_{reg} -Zellen anzulocken

Um weiterhin auszuschließen, dass die Migration der T_{reg} -Zellen zu den JEG-3-Zellen und Primärtrophoblasten hauptsächlich durch Chemokine vermittelt wird, die von beiden Zelltypen sezerniert werden, wurden in diesem Versuchsteil nicht hCG-produzierende Keratinozyten (HaCat) (siehe Tab.12 im Anhang) verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass HaCat-Zellen verschiedene Chemokine produzieren, die potentiell Lymphozyten anlocken können^{[262][263][264][265]}. Unter Verwendung des 2-Kammer Transwell-Systems wurde die Migration der T_{reg} -Zellen zu den HaCat-Zellen untersucht.

Zusätzlich wurden JEG-3-Zellen in die Untersuchung mit einbezogen, da eine effektive Migration der T_{reg} -Zellen zu diesen Zellen bereits nachgewiesen werden konnte. Im Vergleich zu den JEG-3-Zellen waren die HaCat-Zellen nicht in der Lage eine Migration der T_{reg} -Zellen zu induzieren (Abb.45). Signifikante Unterschiede in der Migrationsrate der T_{reg} -Zellen ließen sich zu allen untersuchten Zeitpunkten zwischen den JEG-3-Zellen und HaCat-Zellen feststellen (Abb.45). Daher scheinen Chemokine, die sowohl von JEG-3-Zellen als auch von HaCat-Zellen produziert werden nicht die Hauptattraktoren für T_{reg} -Zellen darzustellen. Vielmehr bestätigen die Ergebnisse eine durch hCG hervorgerufene Migration der T_{reg} -Zellen.

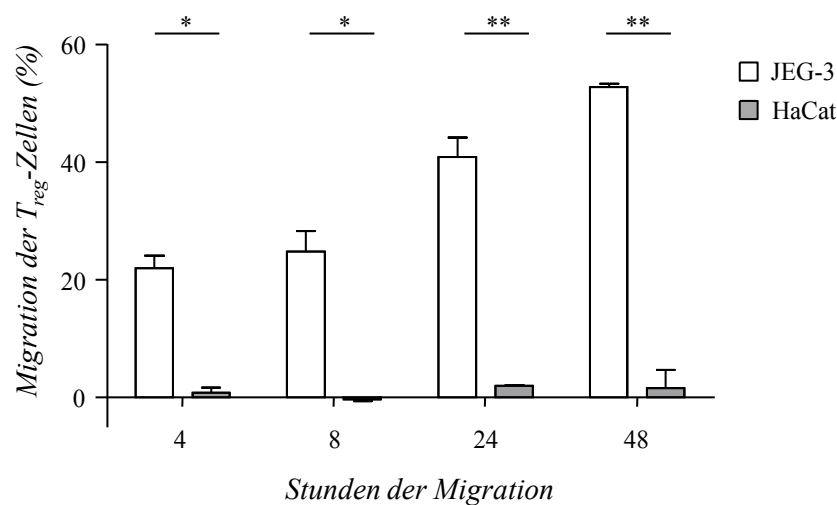


Abb. 45: Nicht hCG-produzierende HaCat-Zellen konnten keine Migration von T_{reg} -Zellen induzieren.

Unter Verwendung eines 2-Kammer-Transwell-Systems wurde die Migration von T_{reg} -Zellen aus normal schwangeren Frauen (n=4) zu hCG-produzierenden JEG-3-Zellen oder nicht hCG-produzierenden HaCat-Zellen untersucht. Die Ermittlung des prozentualen Anteils an migrierten T_{reg} -Zellen bezogen auf die Gesamtzahl eingesetzter T_{reg} -Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Eine Migration von T_{reg} -Zellen zu nicht-hCG-produzierenden HaCat-Zellen konnte im Vergleich zu hCG-produzierenden JEG-3-Zellen nicht nachgewiesen werden. Signifikante Unterschiede in der Migrationsrate von T_{reg} -Zellen zu HaCat-Zellen im Vergleich zu JEG-3-Zellen konnten zu allen untersuchten Zeitpunkten festgestellt werden. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Der paarweise Vergleich zwischen den JEG-3- und HaCat-Zellen wurde mit dem Student's *t*-Test durchgeführt. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

4.3.11 Die siRNA-Behandlung von JEG-3-Zellen resultiert in einer Abnahme der Migrationsrate der T_{reg}-Zellen

Zur letztendlichen Bestätigung eines Einflusses des hCG auf die T_{reg}-Zellmigration wurden JEG-3-Zellen mit siRNA behandelt, die gegen die hCG mRNA gerichtet ist. Die Effizienz der siRNA-Transfektion wurde durch Bestimmung des hCG-Gehalts mittels ELISA in den Zellkulturüberständen transfizierter JEG-3-Zellen bestimmt. Als Kontrollen dienten nicht-transfizierte Zellen oder Zellen, die mit einer irrelevanten (unspezifischen) siRNA transfiziert wurden. Obwohl verschiedene siRNAs unterschiedlicher Sequenz zur Transfektion verwendet wurden, konnte der hCG-Gehalt in den Zellkulturüberständen der mit hCG-siRNA behandelten JEG-3-Zellen im Vergleich zu den mit der Kontroll-siRNA behandelten Zellen nur um 40 % reduziert werden (Abb.46). Die geringe Effizienz der siRNA-Transfektion ließ sich auf die hCG-Gensequenz zurückführen, die auf Grund des hohen Anteils an CG-Wiederholungen die Herstellung spezifischer hCG-siRNAs erschwerte. Dennoch konnte die Migrationsrate der T_{reg}-Zellen nach Behandlung der JEG-3-Zellen mit hCG-siRNA reduziert werden. Im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA behandelten JEG-3-Zellen war die Migration der T_{reg}-Zellen zu den mit hCG-siRNA behandelten JEG-3-Zellen um 30 % verringert (Abb.46). Diese Daten bestätigen eine hCG-vermittelte Migration der T_{reg}-Zellen und unterstreichen die Annahme einer hCG-bedingten Anreicherung von T_{reg}-Zellen an der fetal-mütterlichen Grenzfläche während der Schwangerschaft.

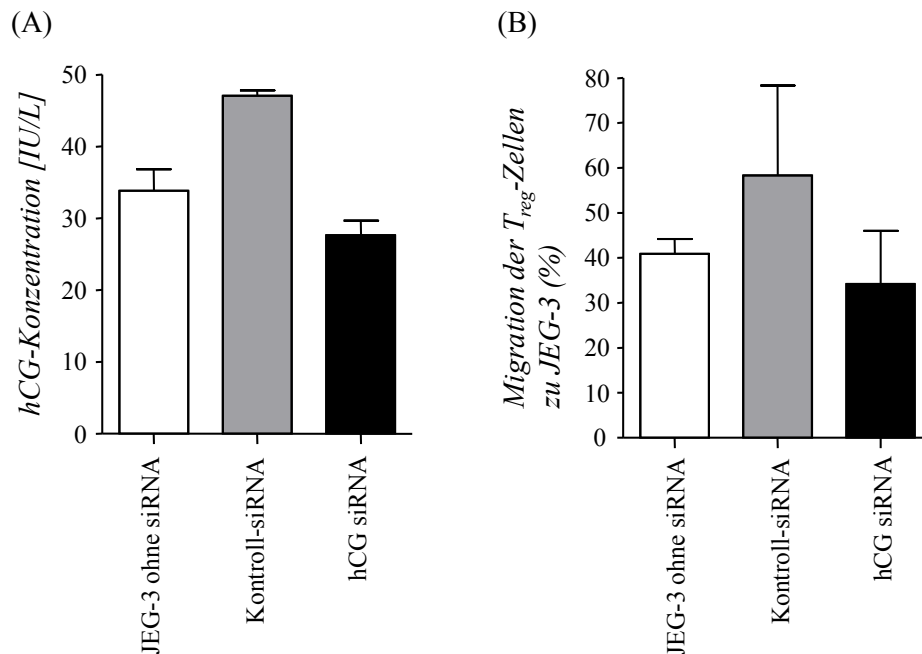


Abb. 46: Die hCG-siRNA Behandlung von JEG-3-Zellen bewirkte eine Reduktion der T_{reg} -Zellmigration.

Nach Behandlung der JEG-3-Zellen mit hCG-siRNA war der hCG-Gehalt im Zellkulturüberstand um 40 % vermindert (A). Die Migration von T_{reg} -Zellen aus normal schwangeren Frauen ($n=2$) fand in einem 2-Kammer-Transwell-System statt. Die Ermittlung des prozentualen Anteils an migrierten T_{reg} -Zellen bezogen auf die Gesamtzahl eingesetzter T_{reg} -Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Durch die siRNA-Behandlung verringerte sich die Migration der T_{reg} -Zellen zu hCG-siRNA-behandelten JEG-3-Zellen im Vergleich zu den Kontroll-siRNA-behandelten JEG-3-Zellen um 30 % (B). Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Der paarweise Vergleich zwischen den hCG-siRNA-behandelten JEG-3-Zellen und den Kontroll-siRNA-behandelten JEG-3-Zellen wurde mit dem Student's t -Test durchgeführt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen siRNA-Behandlungen festgestellt werden.

4.3.12 HCG bewirkt eine Konvertierung von $CD4^+CD25^-$ T-Zellen in T_{reg} -Zellen

Trotz intensiver Untersuchungen der Ursachen für eine Anreicherung der T_{reg} -Zellen an der fetalmütterlichen Grenzzone, sind derzeit noch keine genauen Mechanismen bekannt, die dieses Phänomen während der Schwangerschaft erklären können. Da das für die Proliferation der T_{reg} -Zellen entscheidende Zytokin IL-2 weder beim Menschen noch bei der Maus in der Dezidua oder Plazenta nachgewiesen werden konnte^{[266][267][268]}, ist eine Proliferation der T_{reg} -Zellen direkt an der fetalmütterlichen Grenzzone als unwahrscheinlich anzunehmen. An Hand der in dieser Arbeit gewonnenen Daten konnte das Schwangerschaftshormon hCG als ein Faktor für die T_{reg} -Zellmigration an die fetal-

mütterliche Grenzfläche identifiziert werden. Es stellt sich jedoch weiterhin die Frage, inwieweit T_{reg} -Zellen zusätzlich durch Konvertierung aus naiven T-Zellen generiert werden können und ob hCG zu dieser Konvertierung beiträgt. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden $CD4^+CD25^-$ T-Zellen aus dem Blut von normal schwangeren Frauen isoliert und entweder mit hCG-produzierenden JEG-3-Zellen und Primärtrophoblasten oder mit nicht hCG-produzierenden HaCat-Zellen kokultiviert. Das Ausmaß der Konvertierung der $CD4^+CD25^-$ T-Zellen zu T_{reg} -Zellen wurde an Hand der Expression der T_{reg} -Zellmarker Foxp3, CD25 und CTLA-4 mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Die Kokultur der $CD4^+CD25^-$ T-Zellen mit JEG-3-Zellen oder Primärtrophoblasten führte zu einem signifikanten Anstieg der Expression von Foxp3, CD25 und CTLA-4 in $CD4^+CD25^-$ T-Zellen nach 72 Stunden im Vergleich zur Expression dieser Marker in $CD4^+CD25^-$ T-Zellen, die alleine kultiviert wurden. Darüber hinaus konnte nach 72 Stunden ein signifikanter Anstieg der Expression von Foxp3 und CTLA-4 in $CD4^+CD25^-$ T-Zellen, die mit JEG-3-Zellen kokultiviert wurden gegenüber der Expression in $CD4^+CD25^-$ T-Zellen, die mit HaCat-Zellen kokultiviert wurden, beobachtet werden. Ähnliche Ergebnisse ließen sich auch bei der Kokultur mit Primärtrophoblasten im Vergleich zur Kokultur mit HaCat-Zellen feststellen. Interessanterweise war die Expression von CD25 in $CD4^+CD25^-$ T-Zellen, die mit Primärtrophoblasten kokultiviert wurden, gegenüber $CD4^+CD25^-$ T-Zellen, die mit HaCat-Zellen kokultiviert wurden, ebenfalls nach 72 Stunden signifikant erhöht. Die gewonnenen Ergebnisse lassen vermuten, dass das von Primärtrophoblasten und JEG-3-Zellen gebildete hCG durch Induktion der Expression von T_{reg} -Zellmarkern aktiv zur Konvertierung von $CD4^+CD25^-$ T-Zellen in T_{reg} -Zellen beiträgt und somit einen weiteren Mechanismus beschreibt, der zur Anreicherung dieser Zellen an der fetal-mütterlichen Grenzfläche führt.

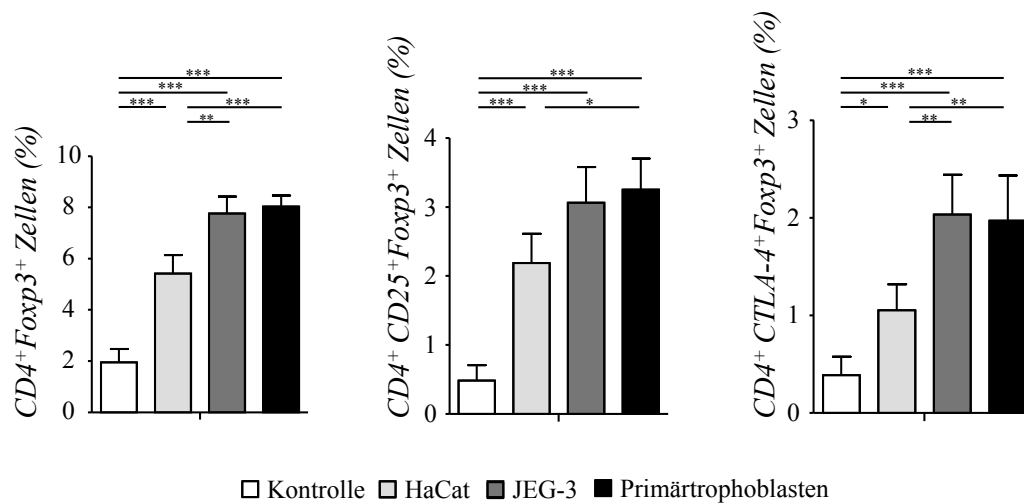


Abb. 14: HCG bewirkte eine Konvertierung von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in T_{reg}-Zellen. Aus normal schwangeren Frauen (n=3) isolierte CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurden mit hCG-produzierenden Primärtrophoblasten und JEG-3-Zellen oder mit nicht-hCG-produzierenden HaCat-Zellen kokultiviert. Die Bestimmung des prozentualen Anteils an CD4⁺Foxp3⁺-, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺- und CD4⁺CTLA-4⁺Foxp3⁺-Zellen bezogen auf die Gesamtzahl an CD4⁺-Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die Kokultur von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen mit Primärtrophoblasten oder JEG-3-Zellen bewirkte im Vergleich zur Kokultur mit HaCat-Zellen eine Induktion von T_{reg}-Zellmarkern und trug somit zur Konvertierung der CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in CD4⁺CD25⁺T_{reg}-Zellen bei. Signifikante Unterschiede ließen sich in der Expression von Foxp3, CD25 und CTLA-4 nach 72 Stunden zwischen der Kokultur mit Primärtrophoblasten und JEG-3-Zellen gegenüber der Kokultur mit HaCat-Zellen feststellen. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Der paarweise Vergleich zwischen den unterschiedlichen Kokulturen wurde mit dem Student's *t*-Test durchgeführt. * = *p* < 0,05; ** = *p* < 0,01; *** = *p* < 0,001.

4.4 Versuchskomplex III: Einfluss des Schwangerschaftshormons

Choriongonadotropin auf die Generierung, Migration und Funktion von T_{reg}-Zellen – Untersuchungen im Maussystem

Im Rahmen dieses Versuchsabschnittes sollten die im Menschen gewonnenen Daten im Maussystem bestätigt und weitere Fragestellungen zum Effekt des hCG auf die T_{reg}-Zellexpansion und -funktion bearbeitet werden. Hierfür wurde das gut etablierte Mausabortmodell verwendet.

Das im Jahr 1980 von Clark und Mitarbeitern beschriebene Abortmodell dient seit Jahrzehnten als Grundlage zur Erforschung immunologisch bedingter Aborte. Das Mausmodell besteht aus zwei unterschiedlichen Verpaarungskombinationen. CBA/J-Weibchen, die mit BALB/c-Männchen verpaart werden, zeigen eine normal verlaufende Schwangerschaft mit gesunden Feten und Plazenten. Der Median der Abortrate liegt bei dieser Verpaarung bei 0 % (Abb.48). Im Gegensatz dazu weisen CBA/J-Weibchen, die mit DBA/2J-Männchen verpaart werden, eine erhöhte Abortrate auf. Der Median der Abortrate liegt bei dieser Verpaarung zwischen 20 und 30 % (Abb.48). Da die Männchen beider Verpaarungen die gleichen Hauptgewebeverträglichkeitsantigene tragen, ist das Auftreten von Spontana-borten auf die unterschiedlichen Nebengewebeverträglichkeitsantigene der Männchen zurückzuführen. Keine signifikanten Unterschiede können in der Anzahl an Implantationen zwischen beiden Verpaarungskombinationen festgestellt werden (Abb.48).

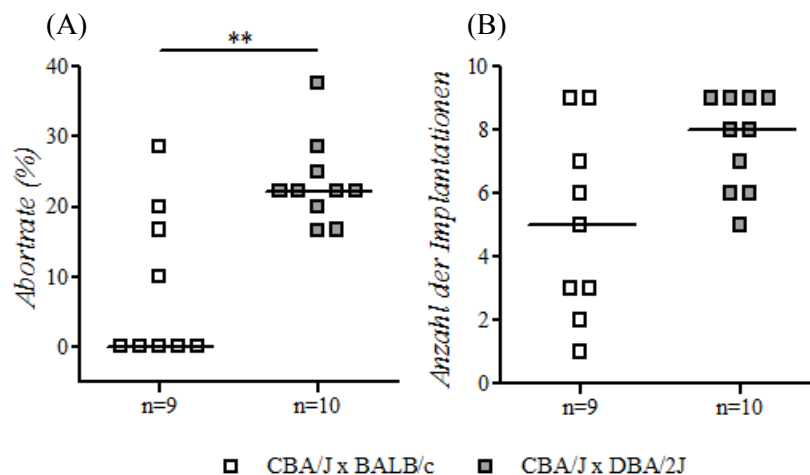


Abb. 48: Die Abortrate der Abortverpaarung CBA/J x DBA/2J war im Vergleich zur Normalschwangerschaftsverpaarung CBA/J x BALB/c signifikant erhöht. Der Median der Abortrate betrug bei den normal schwangeren Mäusen 0 %, wohingegen der Median der Abortrate bei den Abortmäusen zwischen 20 und 30 % lag. Keine signifikanten Unterschiede konnten in der Anzahl der Implantationen zwischen beiden Verpaarungskombinationen festgestellt werden. Die Daten sind als Mediane dargestellt. Der paarweise Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney *U*-Test durchgeführt. ** = $p < 0,01$.

4.4.1 Makroskopische Untersuchungen der fetal-mütterlichen Grenzfläche zeigen Unterschiede zwischen Abort- und Normalverpaarung

Der makroskopische Vergleich der bikornealen Uteri beider Verpaarungsgruppen zeigt einen deutlichen Unterschied bezüglich des Erscheinungsbildes. Der schwangere Uterus der Normalschwangerschaftsverpaarung enthält mehrere Implantationen, die aus gesunden Embryos und Plazenten bestehen (Abb.49). Bei der Abortverpaarung treten neben gesunden Implantationen auch resorbierte Embryos und Plazenten (Aborte) auf, welche aus nekrotisch-hämorrhagischem Gewebe bestehen (Abb.49).

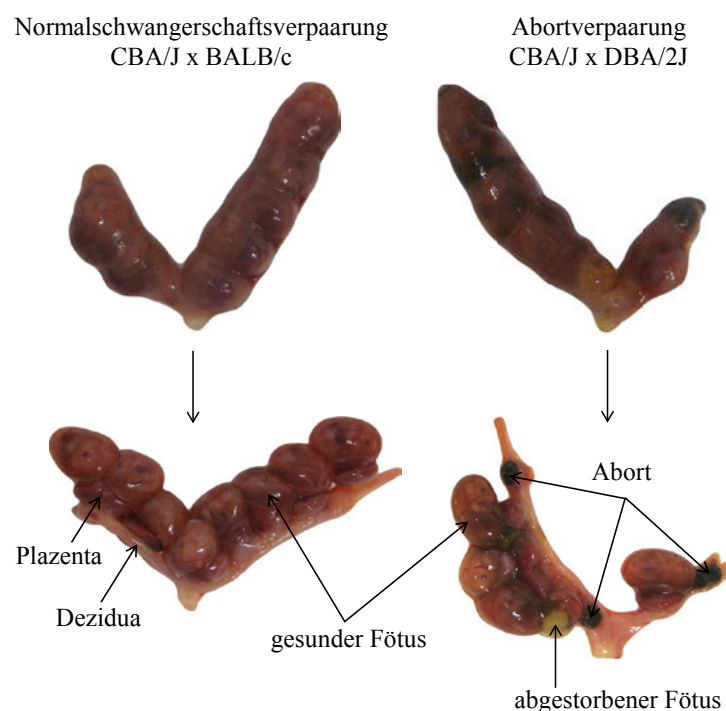


Abb. 49: Die bikornealen Uteri der Normalschwangerschaftsverpaarung CBA/J x BALB/c zeigten im Vergleich zur Abortverpaarung CBA/J x DBA/2J deutliche Unterschiede im makroskopischen Erscheinungsbild. Der Uterus der normal schwangeren CBA/J-Weibchen enthielt mehrere Implantationen, bestehend aus gesunden Feten mit den dazugehörigen Plazenten. Im Gegensatz dazu wies der Uterus der Abortweibchen neben wenigen gesunden Implantationen auch resorbierte Embryos mit Plazenten (Aborte) auf, die aus nekrotisch-hämorrhagischem Gewebe bestanden.

Die mikroskopische Analyse der gesunden Implantationen beider Verpaarungsgruppen zeigt keine Unterschiede. Es lassen sich vier verschiedene Zelltypen an der fetal-mütterlichen Grenzfläche unterscheiden. Am äußeren Rand befindet sich die Dezidua, welche den mütterlichen Teil der fetal-

mütterlichen Grenzfläche darstellt. Daran schließt sich die Plazenta (fetal Teil) an. Sie besteht aus drei verschiedenen Zellschichten. Direkt unter der Dezidua liegen die Riesenzellen, welche durch einen großen Zellkern gekennzeichnet sind. Sie gehen durch Endoreduplikation aus Trophoektodermzellen hervor. Der sich anschließende Spongiotrophoblast setzt sich aus nicht synzytialen Zellen und einigen glykogenreichen Zellen zusammen. Im Inneren der Plazenta befindet sich das Labyrinth, welches sich aus zwei synzytialen Schichten zusammensetzt. Hier findet der Nährstoffaustausch zwischen Mutter und Fetus statt (Abb.50).

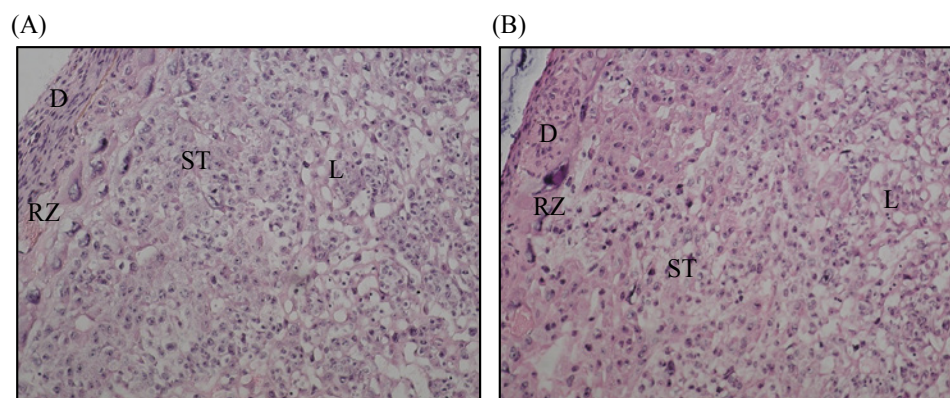


Abb. 50: Die mikroskopische Analyse der fetal-mütterlichen Grenzfläche ergab keine Unterschiede zwischen der Normalschwangerschaftsverpaarung CBA/J x BALB/c und der Abortverpaarung CBA/J x DBA/2J. Die Dezidua (D) (mütterlicher Anteil) grenzt am äußeren Rand an die Plazenta (fetal Anteil). Direkt unter der Dezidua liegen die fetalen Riesenzellen (RZ). Daran schließt sich der Spongiotrophoblast (ST) an. Im Inneren der Plazenta befindet sich das Labyrinth (L). (A) - Normalschwangerschaftsverpaarung. (B) – Abortverpaarung. Vergrößerung: X100.

4.4.2 Die *in vivo* Behandlung von Abortmäusen mit hCG konnte die Abortrate signifikant senken

Nachdem die im Menschen gewonnenen Daten deutlich zeigen konnten, dass hCG die Migration von T_{reg} -Zellen bewirkt und darüber hinaus auch einen Einfluss auf die Konvertierung von humanen $CD4^+CD25^-$ T-Zellen in T_{reg} -Zellen hat, wurde im folgenden Versuchsteil untersucht, inwieweit die durch hCG vermittelte Anreicherung an T_{reg} -Zellen an der fetal-mütterlichen Grenzfläche den Abort in den Abortmäusen verhindern kann. Hierfür wurden Abortmäuse mit 10 IU/ml hCG (in PBS gelöst) behandelt. Um Nebenwirkungen der hCG-Injektion auf den Schwangerschaftsverlauf auszuschließen, wurden zudem normal schwangere Mäuseweibchen ebenfalls mit 10 IU/ml hCG behandelt. Als

Kontrollen dienten PBS-behandelte Mäuse beider Verpaarungsgruppen. Die Injektionen erfolgten an den Schwangerschaftstagen 0, 2, 4 und 6. Am Schwangerschaftstag 10 wurden die Mäuseweibchen getötet und die Abortrate sowie die Anzahl an Implantationen bestimmt. Die Gabe von hCG in die Abortmäuse bewirkte eine signifikante Reduzierung der Abortrate im Vergleich zu Abortmäusen, die mit PBS behandelt wurden (Median: 14,29 % versus 0 %). Die Behandlung von normal schwangeren Mäusen mit hCG zeigte keine Unterschiede zu den PBS-behandelten Mäusen. Ein Einfluss der hCG-Gabe auf die Anzahl an Implantationen war nicht nachweisbar (Abb.51). Ähnlich den Ergebnissen im Menschen konnten die im Maussystem gewonnenen Daten den schützenden Effekt des hCG auf die Schwangerschaft belegen.

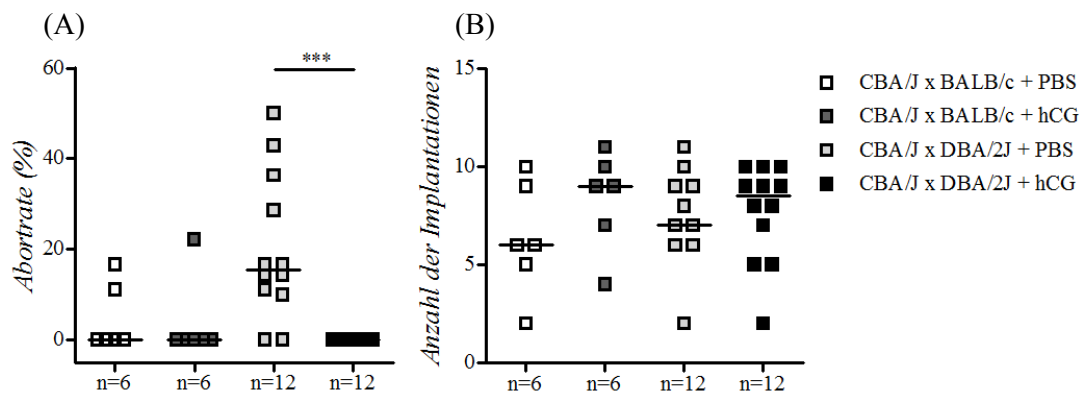


Abb. 51: Die Applikation von 10 IU/ml hCG bewirkte eine signifikante Reduktion der Abortrate in den Abortmäusen. In der Abortverpaarung konnte der Median der Abortrate von 14,29 % (PBS-Behandlung) auf einen Median von 0 % (hCG-Behandlung) gesenkt werden (A). Die hCG-Gabe hatte keinen Einfluss auf die Abortrate der normal schwangeren Mäuse (A). Des Weiteren ließen sich keine Unterschiede durch die hCG-Behandlung auf die Anzahl der Implantationen in beiden Verpaarungen feststellen (B). Die Daten sind als Mediane dargestellt. Der paarweise Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney *U*-Test durchgeführt. *** = $p < 0,001$.

Repräsentative Bilder der bikornealen Uteri beider Verpaarungsgruppen am Tag 10 der Schwangerschaft nach PBS- oder hCG-Behandlung zeigten bei normal schwangeren Mäuseweibchen Uteri mit gesunden Implantationen. Im Vergleich dazu traten bei den mit PBS-behandelten Abortweibchen neben gesunden Embryos auch Resorptionen (Aborte) auf. Nach hCG-Behandlung konnte das Auftreten von Resorptionen vollständig verhindert werden (Abb.52).

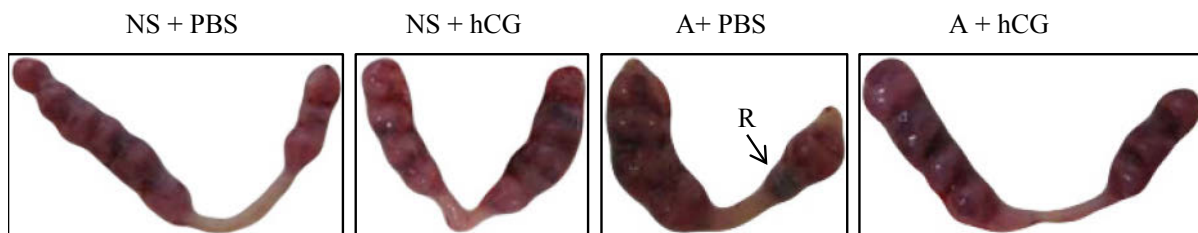


Abb. 52: Die Behandlung der Abortweibchen mit 10 IU/ml hCG verhinderte das Auftreten von Resorptionen (Aborte). Die PBS-Behandlung hatte in beiden Verpaarungsgruppen keinen Einfluss auf die Abortrate. NS - Normalschwangerschaftsverpaarung (CBA/J x BALB/c); A – Abortverpaarung (CBA/J x DBA/2J); R – Resorption

4.4.3 Die *in vivo* Behandlung mit hCG bewirkte eine Expansion von T_{reg}-Zellen im Thymus

In diesem Versuchsabschnitt wurde untersucht, inwieweit der beobachtete schützende Effekt des hCG auf die Schwangerschaft mit einer systemischen als auch lokalen Expansion von T_{reg}-Zellen assoziiert ist. Als Bildungsstätte der T-Zellen kommt dem Thymus bei der Entstehung der natürlichen T_{reg}-Zellen eine besondere Bedeutung zu. Ergebnisse früherer Experimente konnten zeigen, dass das Auftreten von Aborten in Abortmäusen mit einer verminderten Anzahl an T_{reg}-Zellen im Thymus einhergeht^[173]. Es sollte daher analysiert werden, ob die Applikation von hCG die Anzahl an T_{reg}-Zellen im Thymus verändert, was zu einer Reduzierung der Abortrate beitragen könnte. Beide Verpaarungsgruppen wurden entweder mit 10 IU/ml hCG oder PBS an den Schwangerschaftstagen 0, 2, 4 und 6 behandelt und die Anzahl an T_{reg}-Zellen im Thymus mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Die erhobenen Daten konnten zunächst den schon beobachteten signifikanten Unterschied in der Anzahl der T_{reg}-Zellen zwischen den PBS-behandelten Abortmäusen im Vergleich zu den PBS-behandelten normal schwangeren Mäusen bestätigen (Abb.53). Interessanterweise konnte die Gabe von hCG die Anzahl an T_{reg}-Zellen in beiden Verpaarungsgruppen erhöhen (Abb.53). Dabei war die Anzahl an T_{reg}-Zellen in den Abortmäusen nach Gabe von hCG im Vergleich zur Applikation von PBS signifikant erhöht (Abb.53). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass hCG einen Einfluss auf die Bildung oder Expansion von natürlichen T_{reg}-Zellen im Thymus hat. Eine durch hCG-vermittelte erhöhte Entstehungsrate von T_{reg}-Zellen könnte den Mangel an T_{reg}-Zellen in den Abortmäusen kompensieren und somit einen positiven Schwangerschaftsausgang begünstigen.

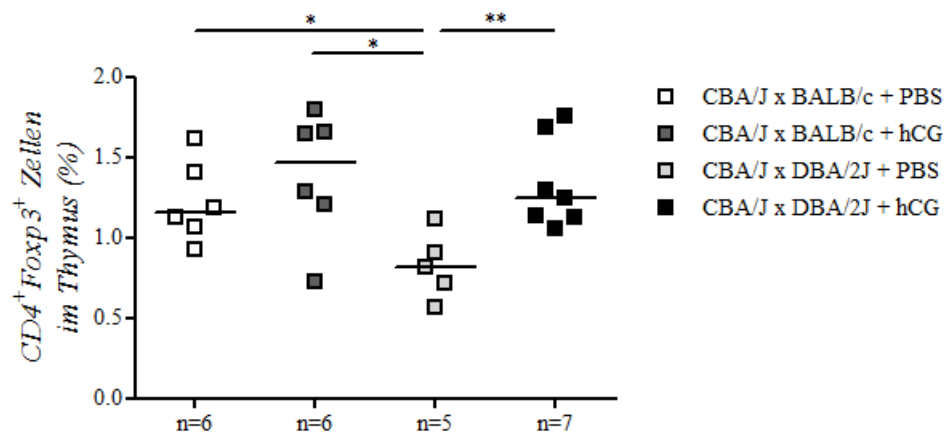


Abb. 53: Die Applikation von 10 IU/ml hCG bewirkte einen signifikanten Anstieg an T_{reg} -Zellen im Thymus. Der prozentuale Anteil an $CD4^+Foxp3^+$ -Zellen bezogen auf die gesamte Lymphozytenpopulation wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. PBS-behandelte Abortmäuse wiesen eine signifikant erhöhte Abortrate im Vergleich zu den PBS-behandelten normal schwangeren Mäuseweibchen auf. Die Gabe von 10 IU/ml hCG konnte den prozentualen Anteil an $CD4^+Foxp3^+ T_{reg}$ -Zellen im Thymus in beiden Verpaarungskombinationen im Vergleich zur PBS-Behandlung steigern. Die Anzahl an T_{reg} -Zellen war nach Behandlung der Abortmäuse mit hCG im Vergleich zu den PBS-behandelten Abortmäusen signifikant erhöht. Die Daten sind als Mediane dargestellt. Der paarweise Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney *U*-Test durchgeführt. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

4.4.4 Die *in vivo* Behandlung mit hCG führt zur Expansion der T_{reg} -Zellen in den lokalen Lymphknoten und in der Peripherie

Vorausgegangene Experimente haben gezeigt, dass die erhöhten Abortraten in den Abortmäusen mit einer verminderten Anzahl an T_{reg} -Zellen in den lokalen Lymphknoten und in der Peripherie (Blut) assoziiert sind^[173]. Daher wurde an dieser Stelle untersucht, inwieweit die Applikation von hCG die Anzahl an T_{reg} -Zellen in den genannten Organen erhöhen und somit den Mangel dieser Zellen in den Abortmäusen kompensieren kann. Zusätzlich zur vermehrten Bildung natürlicher T_{reg} -Zellen im Thymus vermutet man, dass während der Schwangerschaft T_{reg} -Zellen durch Induktion oder *de novo* Konversion aus naiven T-Zellen oder Effektor T-Zellen entstehen. Eine *de novo* Konversion oder Induktion von T_{reg} -Zellen wird in den lokalen Lymphknoten vermutet, da hier väterliche Antigene bereits kurz nach der Insemination nachgewiesen werden konnten^[49]. Neben väterlichen Antigenen spielen für die Konvertierung oft bestimmte, zumeist anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 oder TGF- β eine entscheidende Rolle. Darüber hinaus könnten Hormone einen Einfluss auf die Entstehung von T_{reg} -

Zellen in den Lymphknoten haben. Die unter Zugabe von hCG durchgeführten Konversionsassays mit $CD4^+CD25^-$ T-Zellen aus normal schwangeren Frauen haben gezeigt, dass hCG die Konversion von $CD4^+CD25^-$ T-Zellen in T_{reg} -Zellen unterstützt. Die zudem im Menschen nachgewiesene chemoattraktante Wirkung des hCG auf die T_{reg} -Zellen könnte eine Migration der T_{reg} -Zellen von den lokalen Lymphknoten zur fetal-mütterlichen Grenzfläche erklären. Daher wurde nach Gabe von 10 IU/ml hCG an den Schwangerschaftstagen 0, 2, 4 und 6 die Anzahl an T_{reg} -Zellen in den lokalen Lymphknoten (paraaortische Lymphknoten) und im Blut mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Gabe von hCG einen signifikanten Anstieg an T_{reg} -Zellen in den paraaortischen Lymphknoten im Vergleich zur PBS-Behandlung bewirkte (Abb.54). Demnach ist davon auszugehen, dass hCG die Expansion oder *de novo* Konversion von T_{reg} -Zellen in den lokalen Lymphknoten begünstigt.

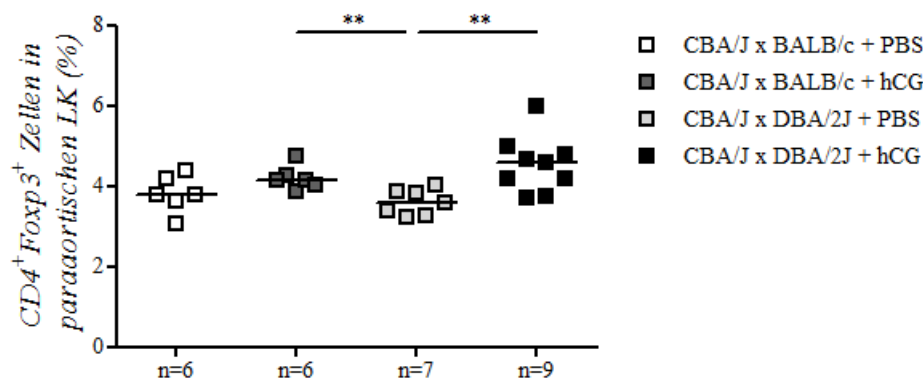


Abb. 54: Die Applikation von 10 IU/ml hCG bewirkte einen signifikanten Anstieg an T_{reg} -Zellen in paraaortischen Lymphknoten. Der prozentuale Anteil an $CD4^+Foxp3^+$ -Zellen bezogen auf die gesamte Lymphozytenpopulation wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Applikation von 10 IU/ml hCG rief einen Anstieg des prozentualen Anteils an $CD4^+Foxp3^+$ T-Zellen in den paraaortischen Lymphknoten (LK) von Abortmäusen und normal schwangeren Mäusen im Vergleich zu den PBS-behandelten Tieren hervor. Dabei war die Anzahl an $CD4^+Foxp3^+$ T-Zellen in den Abortmäusen nach hCG-Behandlung gegenüber den PBS-behandelten Abortmäusen signifikant erhöht. Die Daten sind als Mediane dargestellt. Der paarweise Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney U-Test durchgeführt. ** = $p < 0,01$.

Im Blut konnte ein signifikanter Anstieg der $CD4^+Foxp3^+$ T-Zellen nach Applikation von 10 IU/ml hCG in den normal schwangeren Mäusen und Abortmäusen im Vergleich zur Gabe von PBS nachgewiesen werden. (Abb.55). Die erhöhte Anzahl an T_{reg} -Zellen im Blut lässt auf eine durch hCG-

vermittelte erhöhte Migrationsrate der T_{reg}-Zellen von den lokalen Lymphknoten zur fetal-mütterlichen Grenzfläche schließen.

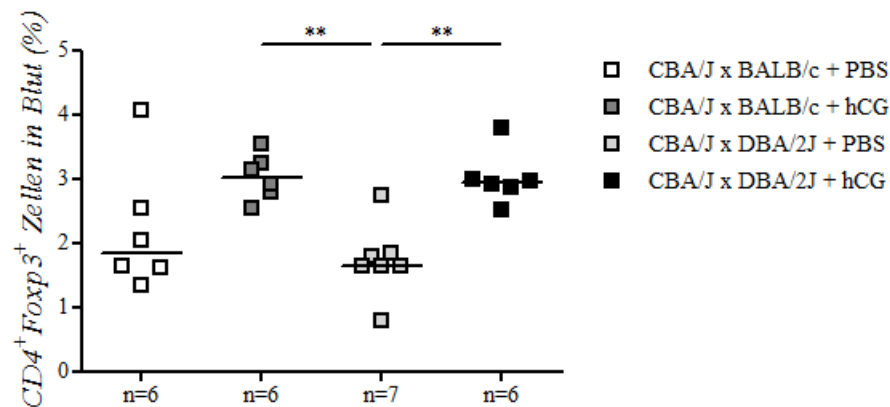


Abb. 55: Die Applikation von 10 IU/ml hCG bewirkte einen signifikanten Anstieg an T_{reg}-Zellen im Blut. Der prozentuale Anteil an CD4⁺Foxp3⁺-Zellen bezogen auf die gesamte Lymphozytenpopulation wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Gabe von 10 IU/ml hCG verursachte im Vergleich zur Gabe von PBS einen signifikanten Anstieg des prozentualen Anteils an CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen im Blut beider Verpaarungskombinationen. Die Daten sind als Mediane dargestellt. Der paarweise Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney U-Test durchgeführt. ** = p < 0,01.

An Hand der gewonnenen Daten ist anzunehmen, dass hCG die Bildung von T_{reg}-Zellen in den para-aortischen Lymphknoten begünstigt und anschließend die Migration der T_{reg}-Zellen zur fetal-mütterlichen Grenzfläche vermittelt.

4.4.5 HCG führt zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl an T_{reg}-Zellen direkt an der fetal-mütterlichen Grenzfläche

Die Präsenz von T_{reg}-Zellen an der fetal-mütterlichen Grenzfläche ist für die erfolgreiche Schwangerschaft entscheidend, weil hierdurch mütterliche Immunantworten, die sich gegen den Feten richten, direkt vor Ort supprimiert werden können. Daher lässt sich das Auftreten von Aborten bei Mensch und Maus oft mit einer verminderten Anzahl an T_{reg}-Zellen in Verbindung bringen. In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob die Gabe von 10 IU/ml hCG, die nachweislich die Abortrate senken konnte, einen Anstieg an T_{reg}-Zellen in der Dezidua bewirkte. Entsprechend den Erwartungen konnte eine verminderte Menge an T_{reg}-Zellen in PBS-behandelten Abortmäusen im Vergleich zu PBS-behandelten

normal schwangeren Mäusen nachgewiesen werden ($p = 0,1$) (Abb.56). Die Gabe von hCG bewirkte eine signifikante Erhöhung an T_{reg} -Zellen in den Abortmäusen im Vergleich zu den PBS-behandelten Kontrollen (Abb.56). Demnach ist zu vermuten, dass der durch hCG hervorgerufene Anstieg den Mangel an T_{reg} -Zellen in den Abortmäusen ausgleicht und die Akzeptanz der Mutter gegenüber dem Fetus unterstützt.

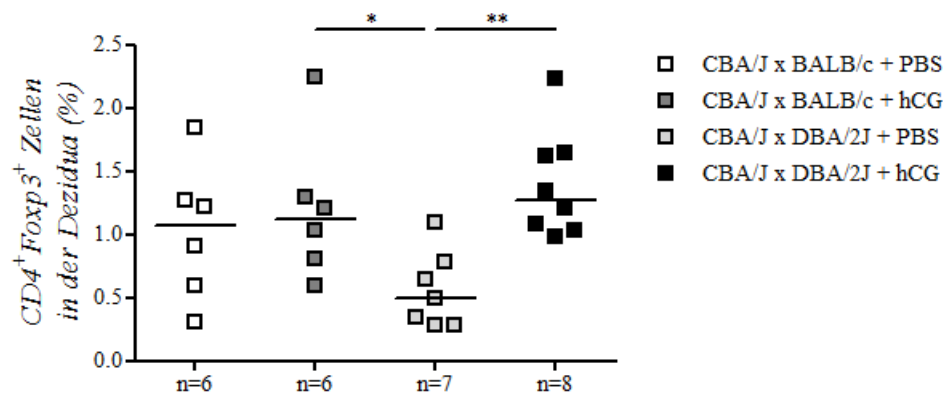


Abb. 56: Die Applikation von 10 IU/ml hCG bewirkte einen signifikanten Anstieg an T_{reg} -Zellen in der Dezidua. Der prozentuale Anteil an $CD4^+Foxp3^+$ -Zellen bezogen auf die gesamte Lymphozytenpopulation wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Es konnte ein deutlicher Trend zu einer verminderten Anzahl an $CD4^+Foxp3^+$ T-Zellen in den PBS-behandelten Abortmäusen gegenüber den PBS-behandelten normal schwangeren Mäusen ausgemacht werden ($p = 0,1$). Die Applikation von 10 IU/ml hCG erhöhte den prozentualen Anteil an $CD4^+Foxp3^+$ T-Zellen in der Dezidua im Vergleich zu den PBS-behandelten Kontrollen signifikant. Die Daten sind als Mediane dargestellt. Der paarweise Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney U-Test durchgeführt. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Weitere Analysen der prozentualen Anzahl an $CD4^+Foxp3^+$ T-Zellen in der Milz sowie den axillären und inguinalen Lymphknoten ergaben statistisch nicht signifikante Unterschiede zwischen den hCG- und PBS-behandelten Tieren (Tab.8). Dabei war der Anteil an $CD4^+Foxp3^+$ T-Zellen in den hCG-behandelten Mäuseweibchen tendenziell gegenüber den PBS-behandelten Mäuseweibchen beider Paarungsgruppen erhöht (Tab.8). Signifikante Unterschiede ließen sich nur in den mesenterischen Lymphknoten von hCG-behandelten Abortmäusen im Vergleich zu den PBS-behandelten Abortmäusen nachweisen (Tab.8).

Tab. 8: Die Applikation von 10 IU/ml hCG bewirkte einen leichten Anstieg an T_{reg}-Zellen in der Milz und den axillären und inguinalen Lymphknoten sowie einen signifikanten Anstieg an T_{reg}-Zellen in den mesenterischen Lymphknoten. Der prozentuale Anteil an CD4⁺Foxp3⁺-Zellen bezogen auf die gesamte Lymphozytenpopulation wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Gabe von 10 IU/ml hCG bewirkte in der Milz sowie den axillären und inguinalen Lymphknoten einen leichten Anstieg an CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen im Vergleich zu den PBS-behandelten Kontrollen. In den mesenterischen Lymphknoten konnte durch die Gabe von hCG ein signifikanter Unterschied an CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen in Abortmäusen im Vergleich zu den PBS-behandelten Tieren erreicht werden. Die Daten sind als Mediane^[Minimum/Maximum] dargestellt. Der paarweise Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney *U*-Test durchgeführt. * = *p* < 0,05.

Verpaarung	Applikation	N	Milz	N	Axilläre Lymphknoten	N	Mesenterische Lymphknoten	N	Inguinale Lymphknoten
(1) CBA/J x BALB/c	PBS	6	1,77 ^[1,37/2,17]	6	3,98 ^[3,09/4,60]	6	4,74 ^[3,70/5,72]	6	4,34 ^[3,60/5,14]
(2) CBA/J x BALB/c	10 IU/ml hCG	6	1,86 ^[1,51/2,09]	6	4,60 ^[3,27/5,92]	6	4,81 ^[3,92/6,44]	6	4,79 ^[3,99/6,49]
(3) CBA/J x DBA/2J	PBS	8	1,52 ^[0,64/2,56]	7	4,08 ^[3,44/4,45]	6	3,72 ^[2,64/4,45] *(zu 4)	7	3,83 ^[2,27/5,15]
(4) CBA/J x DBA/2J	10 IU/ml hCG	8	1,54 ^[1,00/1,99]	8	4,14 ^[2,98/4,56]	8	4,98 ^[4,37/6,15]	9	4,54 ^[3,15/6,00]

4.4.6 Untersuchung des Effektes der *in vivo* Behandlung von hCG auf die totale Anzahl an CD11c⁺-Zellen und deren Reifenzustand in der Milz und der Dezidua

Obwohl ein systemischer und lokaler Anstieg an T_{reg}-Zellen nach Gabe von hCG nachgewiesen werden konnte, ist nicht geklärt, ob die Expansion der T_{reg}-Zellen durch eine direkte Bindung des hCG an den LH/CG Rezeptor hervorgerufen wird oder ob der Anstieg über einen indirekten, durch hCG-vermittelten Weg induziert wird. In diesem Zusammenhang konnten *in vitro* Daten von Segerer und Kollegen zeigen, dass hCG einen Effekt auf die Reifung und Funktion von DZ hat^[269]. Die Anwesenheit von hCG konnte die HLA-DR-Expression auf unreifen DZ inhibieren und die stimulatorische Kapazität der DZ gegenüber T-Zellen signifikant reduzieren. Weitere Daten von Wan und Kollegen konnten den Effekt des hCG auf die Induktion eines tolerogenen Phänotyps bestätigen^[249]. Die Autoren zeigten, dass DZ, die mit LPS und IFN- γ stimuliert wurden, nach hCG-Gabe weniger MHC II exprimierten. Darüber hinaus konnten sie einen Anstieg der IL-10-Produktion in den DZ nachweisen, der mit einer verminderten antigenspezifischen T-Zellproliferation einherging. Diese Beobachtungen

zeigen deutlich, dass hCG die Ausbildung eines tolerogenen Phänotyps der DZ begünstigt. In einem weiteren Versuch konnten Wakkach und Kollegen demonstrieren, dass tolerogene DZ zur Expansion von T_{reg} -Zellen beitragen^[50]. An Hand dieser Daten könnte eine durch hCG bedingte Induktion eines tolerogenen Phänotyps von DZ indirekt die Expansion von T_{reg} -Zellen unterstützen (unveröffentlichte Daten von Dr. Paul Wafula). Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde der Effekt des hCG auf die totale Anzahl von DZ ($CD11c^+$) und deren Reifezustand ($CD80^+ MHCII^+$) in der Milz und der Dezidua untersucht. Hierfür wurden Abortweibchen an den Schwangerschaftstagen 0, 2, 4 und 6 mit 10 IU/ml hCG oder PBS behandelt. Die totale Anzahl an DZ ($CD11c^+$) sowie die Anzahl an reifen DZ wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

4.4.6.1 Die *in vivo* Behandlung mit hCG hat keinen Einfluss auf die Anzahl an $CD11c^+$ -Zellen in der Milz

Die gewonnenen Daten konnten zeigen, dass die Behandlung mit hCG im Vergleich zur PBS-Behandlung keinen Einfluss auf die Anzahl an $CD11c^+$ -Zellen in der Milz hatte (Abb.57). Daher ist davon auszugehen, dass hCG keine Veränderung der Anzahl an DZ in der Milz bedingt.

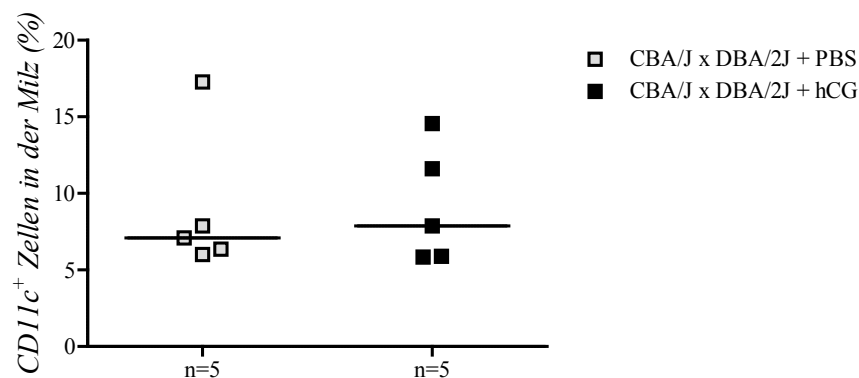


Abb. 57: Die Applikation von 10 IU/ml hCG hatte keinen Einfluss auf die Anzahl an $CD11c^+$ -Zellen in der Milz. Der prozentuale Anteil an $CD11c^+$ -Zellen bezogen auf die gesamte DZ-Population wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Gabe von 10 IU/ml hCG in die Abortmäuse rief im Vergleich zur Gabe von PBS keine Veränderung in der Anzahl an $CD11c^+$ -Zellen in der Milz hervor. Die Daten sind als Mediane dargestellt. Der paarweise Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney *U*-Test durchgeführt. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden

4.4.6.2 Die *in vivo* Behandlung mit hCG kann die Anzahl an CD11c⁺MHCII⁺- und CD11c⁺CD80⁺-Zellen in der Milz nur leicht reduzieren

Die Fähigkeit zur antigenspezifischen Stimulation von T-Zellen hängt maßgeblich vom Reifezustand der DZ ab. Entscheidend für die Antigenpräsentation ist die Expression von MHCII-Molekülen auf der Oberfläche der DZ. Darüber hinaus ist für eine erfolgreiche Aktivierung von Effektor T-Zellen die Expression von kostimulatorischen Molekülen wie CD80/CD86 notwendig. Somit lässt sich durch die Bestimmung der Expression von MHCII und CD80 das Potenzial der DZ zur klassischen Aktivierung der Effektor T-Zellen ermitteln. Im Gegensatz zur Aktivierung von Effektor T-Zellen wurde beschrieben, dass unreife DZ die Induktion von T_{reg}-Zellen begünstigen. Die Anzahl an reifen DZ (CD11c⁺CD80⁺ und CD11c⁺MHCII⁺) in der Milz wurde nach hCG- oder PBS-Behandlung der Abortmäuse mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass die Gabe von 10 IU/ml hCG im Vergleich zur Gabe von PBS die Anzahl an CD11c⁺CD80⁺-Zellen und CD11c⁺MHCII⁺-Zellen in der Milz nur leicht reduziert (Abb.58).

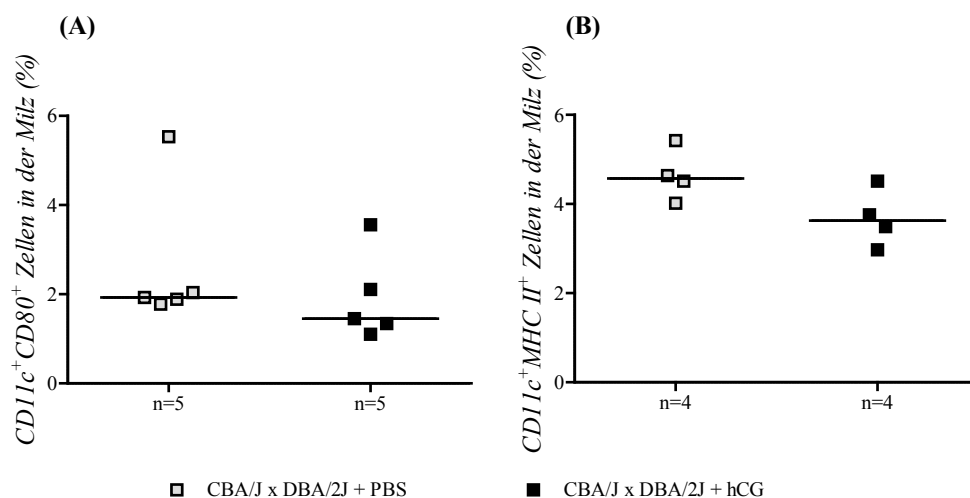


Abb. 58: Die Applikation von 10 IU/ml hCG reduzierte die Anzahl an CD11c⁺CD80⁺- und CD11c⁺MHCII⁺-Zellen in der Milz nur leicht. Der prozentuale Anteil an CD11c⁺CD80⁺- (A) und CD11c⁺MHCII⁺- (B) Zellen bezogen auf die gesamte DZ-Population wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Gabe von 10 IU/ml hCG in die Abortmäuse verminderte im Vergleich zur Gabe von PBS die Anzahl CD11c⁺CD80⁺- und CD11c⁺MHCII⁺-Zellen nur geringfügig. Die Daten sind als Mediane dargestellt. Der paarweise Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede detektiert werden.

4.4.6.3 Die *in vivo* Behandlung mit hCG kann die Expression von MHCII und CD80 in CD11c⁺-Zellen in der Milz nicht beeinflussen

Zusätzlich zur Bestimmung der Anzahl an CD11c⁺CD80⁺- und CD11c⁺MHCII⁺-Zellen wurde die Expression von CD80 und MHCII in CD11c⁺ Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt. (Abb.59). Die Ergebnisse konnten zeigen, dass die hCG-Behandlung keinen Einfluss auf die Expression beider Moleküle in CD11c⁺-Zellen hatte (Abb.59). Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die Gabe von hCG keinen wesentlichen Einfluss auf die Anzahl und den Reifezustand der DZ in der Milz hat.

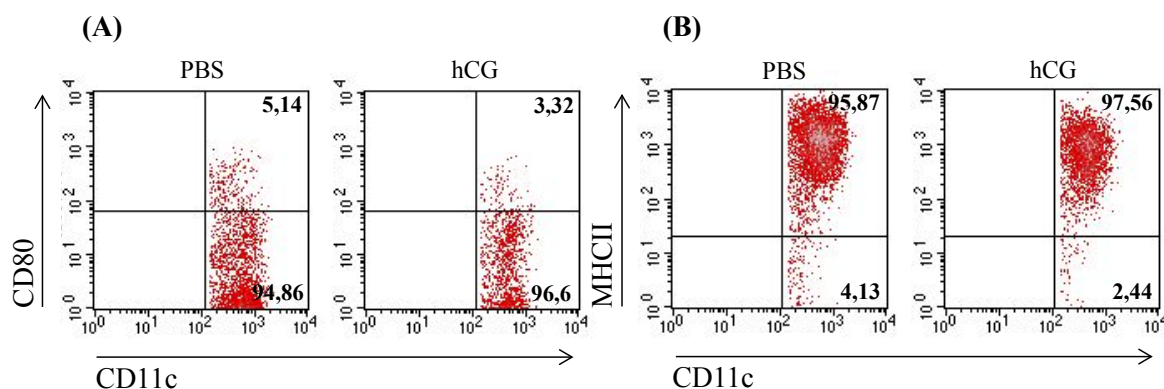


Abb. 59: Die Gabe von 10 IU/ml hCG bewirkte keine Veränderung der Expression von CD80 und MHCII in CD11c⁺-Zellen in der Milz. Mittels Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Anteil an CD11c⁺-Zellen, die CD80 (A) oder MHCII (B) exprimieren bezogen auf die gesamte CD11c⁺-Zellpopulation bestimmt. Repräsentative Dot Plot-Analysen zeigen, dass der Anteil an CD11c⁺-Zellen, die CD80 exprimieren nach Gabe von 10 IU/ml hCG (3,32 %) im Vergleich zur Gabe von PBS (5,14 %) leicht vermindert, jedoch nicht statistisch unterschiedlich war. Keine Unterschiede ließen sich in der Expression von MHCII in CD11c⁺-Zellen zwischen hCG- und PBS-behandelten Abortmäusen (97,56 % versus 95,87 %) feststellen.

4.4.6.4 Die *in vivo* Behandlung mit hCG führt zu einer signifikanten Reduktion in der Anzahl an CD11c⁺-Zellen in der Dezidua

Im Gegensatz zur Milz bewirkte die Behandlung mit 10 IU/ml hCG im Vergleich zur PBS-Behandlung eine signifikante Reduktion der Anzahl an CD11c⁺-Zellen in der Dezidua (Abb.60). Infolgedessen kann vermutet werden, dass hCG die Anzahl an CD11c⁺-Zellen an der fetal-mütterlichen Grenzfläche moduliert und somit einen Einfluss auf die Antigenpräsentation gegenüber Effektor T-Zellen nimmt.

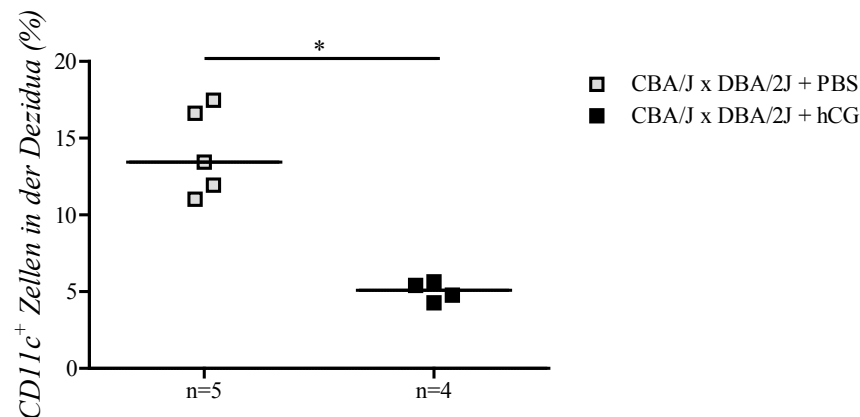


Abb. 60: Die Applikation von 10 IU/ml hCG bewirkte eine signifikante Reduktion der Anzahl an CD11c⁺-Zellen in der Dezidua. Der prozentuale Anteil an CD11c⁺-Zellen bezogen auf die gesamte DZ-Population wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Gabe von 10 IU/ml hCG in die Abortmäuse reduzierte im Vergleich zur Gabe von PBS die Anzahl an CD11c⁺-Zellen in der Dezidua signifikant. Die Daten sind als Mediane dargestellt. Der paarweise Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney *U*-Test durchgeführt. * = $p < 0,05$.

4.4.6.5 Die *in vivo* Behandlung mit hCG kann die Anzahl an CD11c⁺MHCII⁺- und CD11c⁺CD80⁺-Zellen in der Dezidua deutlich reduzieren

Zusätzlich zur Bestimmung des Anteils an totalen CD11c⁺-Zellen wurde die Anzahl an reifen DZ (CD11c⁺CD80⁺ und CD11c⁺MHCII⁺) nach Gabe von hCG- oder PBS mittels Durchflusszytometrie in der Dezidua ermittelt. Im Gegensatz zur Milz war die Anzahl an CD11c⁺CD80⁺- und CD11c⁺MHCII⁺-Zellen in der Dezidua nach Gabe von hCG im Vergleich zur Gabe von PBS signifikant reduziert (Abb.61).

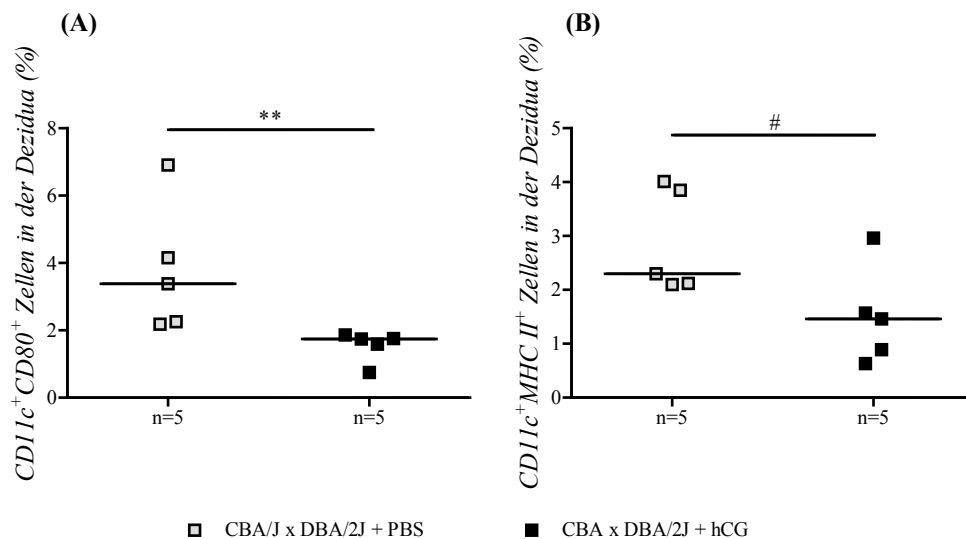


Abb. 61: Die Applikation von 10 IU/ml hCG rief eine deutliche Reduktion der Anzahl an $CD11c^{+}CD80^{+}$ - und $CD11c^{+}MHCII^{+}$ -DZ in der Dezidua hervor. Der prozentuale Anteil an $CD11c^{+}CD80^{+}$ (A) - und $CD11c^{+}MHCII^{+}$ (B) -Zellen bezogen auf die gesamte DZ-Population wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Applikation von 10 IU/ml hCG in die Abortmäuse bewirkte im Vergleich zur PBS-Behandlung eine signifikante Reduktion der Anzahl an $CD11c^{+}CD80^{+}$ -Zellen in der Dezidua. Deutliche Unterschiede konnten zudem in der Anzahl an $CD11c^{+}MHCII^{+}$ -Zellen zwischen hCG- und PBS-behandelten Abortmäusen festgestellt werden. Die Daten sind als Mediane dargestellt. Der paarweise Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney U-Test durchgeführt. # = $p = 0,055$; ** = $p < 0,01$.

4.4.6.6 Die *in vivo* Behandlung mit hCG kann die Expression von CD80, jedoch nicht von MHCII in $CD11c^{+}$ -Zellen in der Dezidua deutlich reduzieren

Neben der Bestimmung des Anteils an $CD11c^{+}CD80^{+}$ -Zellen und $CD11c^{+}MHCII^{+}$ -Zellen wurde auch die Expression von CD80 und MHCII in $CD11c^{+}$ -Zellen nach Behandlung der Abortmäuse mit hCG- oder PBS in der Dezidua untersucht. Die Gabe von 10 IU/ml hCG bewirkte im Vergleich zur Behandlung mit PBS eine deutliche Reduktion der CD80-Expression in $CD11c^{+}$ -Zellen (Abb.62). Keine Unterschiede ließen sich jedoch in der MHCII-Expression in den $CD11c^{+}$ -Zellen nachweisen (Abb.62). Demnach scheint hCG die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD80 auf dezidualen DZ zu modulieren, sich jedoch nicht auf die Expression von MHCII auszuwirken.

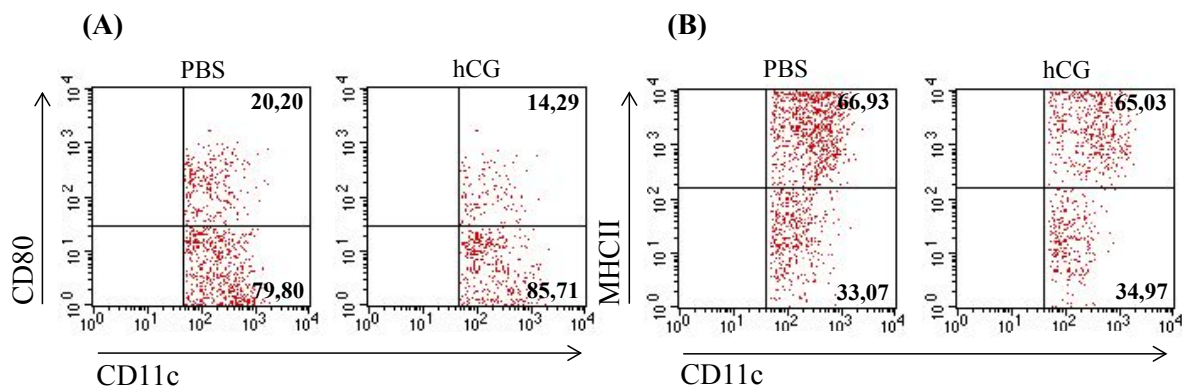


Abb. 62: Die Gabe von 10 IU/ml hCG bewirkte eine Reduktion der Expression von CD80, jedoch nicht von MHCII in CD11c⁺-Zellen in der Dezidua. Mittels Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Anteil an CD11c⁺-Zellen, die CD80 (A) oder MHCII (B) exprimieren bezogen auf die gesamte CD11c⁺-Zellpopulation bestimmt. Repräsentative Dot Plot-Analysen zeigen, dass der Anteil an CD11c⁺-Zellen, die CD80 exprimieren nach Gabe von 10 IU/ml hCG (14,29 %) im Vergleich zur Gabe von PBS (20,20 %) deutlich verringert war. Keine Unterschiede ließen sich in der Expression von MHCII in CD11c⁺-Zellen zwischen hCG- und PBS-behandelten Abortmäusen (65,03 % versus 66,93 %) feststellen.

Insgesamt konnten die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen *in vivo* Ergebnisse die *in vitro* Daten anderer Arbeitsgruppen bezüglich des Effekts von hCG auf den Reifezustand der DZ bestätigen. Insbesondere bewirkte die Applikation von hCG im Abortmodell eine signifikante Erniedrigung der DZ an der fetal-mütterlichen Grenzfläche und beeinflusste deren Reifezustand. Der durch hCG induzierte tolerogene Phänotyp der DZ könnte als möglicher Ansatzpunkt zur Erklärung der hCG-vermittelten Expansion der T_{reg}-Zellen dienen.

4.4.7 Die Expansion von T_{reg}-Zellen wird durch deziduale CD11c⁺-Zellen, jedoch nicht durch CD11c⁺-Zellen aus der Milz vermittelt

Der Effekt des hCG auf die totale Anzahl an DZ sowie deren Reifezustand in der Dezidua lässt vermuten, dass die nach hCG-Gabe beobachtete Expansion an T_{reg}-Zellen durch tolerogene DZ vermittelt wird. Um diese Annahme zu bestätigen wurden Abortmäuse mit 10 IU/ml hCG oder PBS an den Schwangerschaftstagen 0, 2, 4 oder 6 behandelt. Am Schwangerschaftstag 10 wurden CD11c⁺-Zellen aus der Dezidua oder aus der Milz isoliert. Die isolierten CD11c⁺-Zellen wurden anschließend mit CD4⁺ T-Zellen aus den paraaortischen Lymphknoten kokultiviert. Die Foxp3-Expression in den CD4⁺ T-Zellen wurde nach 24 und 48 Stunden mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Es konnte gezeigt

werden, dass CD11c⁺-Zellen aus der Dezidua von hCG-behandelten Abortmäusen einen im Vergleich zu PBS-behandelten Abortmäusen signifikanten Anstieg an CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen nach 24 Stunden Kokultur bewirkten (Abb.63). Im Gegensatz dazu konnten die CD11c⁺-Zellen aus der Milz von hCG-behandelten Abortmäusen keine Veränderung in der Anzahl an CD4⁺Foxp3⁺-T-Zellen hervorrufen (Abb.63).

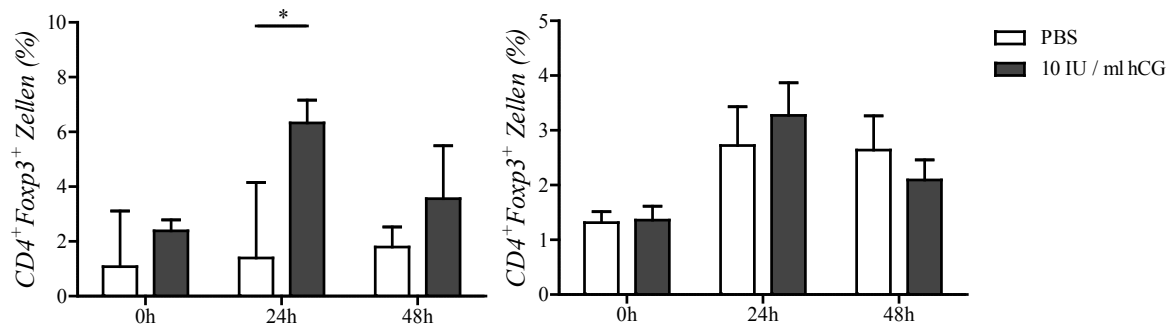


Abb. 63: Deziduale CD11c⁺-Zellen induzierten nach *in vivo* Behandlung mit hCG einen Anstieg an CD4⁺Foxp3⁺-Zellen. Der prozentuale Anteil an CD4⁺Foxp3⁺-Zellen bezogen auf die Gesamtzahl an CD4⁺-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Kokultivierung von dezidualen CD11c⁺-Zellen mit CD4⁺ T-Zellen aus paraaortischen Lymphknoten bewirkte nach *in vivo* Behandlung mit hCG im Vergleich zur PBS-Behandlung eine signifikante Steigerung der Anzahl an CD4⁺Foxp3⁺-Zellen (A). Kein Einfluss des hCG konnte auf die Anzahl der CD4⁺Foxp3⁺-Zellen nach Kokultivierung mit CD11c⁺-Zellen aus der Milz festgestellt werden (B). Das Assay wurde pro Behandlung drei Mal mit Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Der paarweise Vergleich zwischen den unterschiedlichen Kokulturen wurde mit dem Student's *t*-Test durchgeführt. * = *p* < 0,05.

Die gewonnenen Daten konnten die Vermutung einer durch tolerogene DZ hervorgerufenen T_{reg}-Zellexpansion nach hCG-Gabe bestätigen. Dabei scheint die indirekt durch hCG-vermittelte Expansion von T_{reg}-Zellen in erster Linie direkt an der fetal-mütterlichen Grenzfläche stattzufinden, da das hCG vor allem hier den Phänotyp der dezidualen DZ moduliert. Ein direkter Einfluss des hCG auf die Proliferation der T_{reg}-Zellen durch Bindung an den LH/CG Rezeptor wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Da erste Ergebnisse jedoch darauf hinweisen, dass hCG die Expression von Foxp3 in naiven T-Zellen induzieren kann, wäre ein direkter Einfluss des hCG auf die T_{reg}-Zellproliferation denkbar.

4.4.8 Die *in vivo* Applikation von hCG steigert die Suppressivität von T_{reg}-Zellen aus Milz und Lymphknoten, jedoch nicht von thymalen T_{reg}-Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass hCG einen Einfluss auf die Migration und Generierung von T_{reg}-Zellen hat, wurde in einem weiteren Experiment untersucht, inwieweit hCG die suppressive Funktion der T_{reg}-Zellen beeinflusst. In diesem Zusammenhang konnte schon im Jahr 1980 von Fuchs und Kollegen gezeigt werden, dass hCG die Entstehung von humanen Suppressor T-Zellen induziert, die daraufhin die T-Zell-abhängige Aktivierung von B-Zellen hemmen konnten^[270]. Demnach wäre zu vermuten, dass hCG die suppressive Funktion der T_{reg}-Zellen gegenüber anderen Immunzellen (z.B. T-Zellen) steigern kann. Zur Analyse dieser Fragestellung wurden Abortweibchen mit 10 IU/ml hCG oder PBS an den Schwangerschaftstagen 0, 2, 4 und 6 behandelt. T_{reg}-Zellen und CD4⁺CD25⁻ Effektor T-Zellen wurden aus den behandelten Tieren isoliert und zusammen mit APZs aus DBA/2J-Männchen in einer MLR kokultiviert. Die Wirkung der T_{reg}-Zellen auf die Proliferation der CD4⁺CD25⁻ Effektor T-Zellen wurde analysiert. CD4⁺CD25⁺ T_{reg}-Zellen und CD4⁺CD25⁻ Effektor T-Zellen wurden aus einem Gemisch von Milz und lokalen Lymphknoten sowie aus dem Thymus getrennt untersucht. CD4⁺CD25⁺ T_{reg}-Zellen aus Milz und Lymphknoten hatten einen stark suppressiven Einfluss auf die CD4⁺CD25⁻ Effektor T-Zellen, unabhängig von der Gabe von hCG oder PBS (Abb.64). Interessanterweise konnten jedoch die T_{reg}-Zellen aus den hCG-behandelten Abortmäusen die Proliferation der CD4⁺CD25⁻ Effektor T-Zellen stärker hemmen als die T_{reg}-Zellen aus den PBS-behandelten Kontrollen (Abb.64). Dieser Effekt war zu beiden untersuchten Zeitpunkten nachweisbar. Infolgedessen wäre zu vermuten, dass hCG die suppressive Funktion von T_{reg}-Zellen, die in der Milz und den Lymphknoten generiert werden, während der Schwangerschaft verstärkt. Eine genauere Analyse der T_{reg}-Zellen aus Milz oder Lymphknoten war auf Grund der Ausbeute an T_{reg}-Zellen nach Isolierung mittels magnetischer Zellsortierung nicht möglich. Weiterführende Untersuchungen könnten in Zukunft Aufschluss darüber geben, ob hCG die Funktion von T_{reg}-Zellen aus beiden Organen oder nur aus Milz oder Lymphknoten modulieren kann.

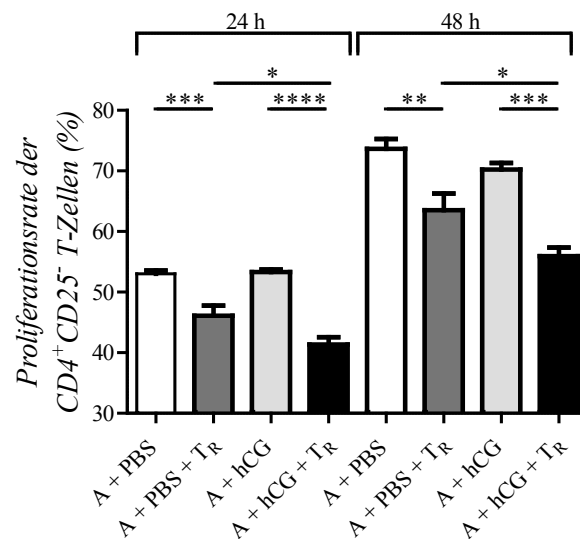


Abb. 64: Die *in vivo* Applikation von 10 IU/ml hCG erhöhte die suppressive Kapazität der T_{reg}-Zellen aus Milz und Lymphknoten gegenüber Effektor T-Zellen signifikant. Beide Zelltypen wurden aus einem Gemisch aus Milz und Lymphknoten isoliert. Zur Ermittlung der Proliferationsrate wurden die CD4⁺CD25⁻ Effektor T-Zellen mit dem Farbstoff CFDA-SE gefärbt. Der prozentuale Anteil an proliferierten Effektor T-Zellen bezogen auf die Gesamtzahl der Effektor T-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die T_{reg}-Zellen konnten unabhängig von der Gabe von 10 IU/ml hCG oder PBS die Proliferation der CD4⁺CD25⁻ Effektor T-Zellen signifikant hemmen. Darüber hinaus war der hemmende Effekt der T_{reg}-Zellen aus den hCG-behandelten Abortmäusen auf die Proliferation der CD4⁺CD25⁻ Effektor T-Zellen im Vergleich zu den PBS-behandelten Kontrollen signifikant erhöht. Die Proliferationsassays wurden mindestens drei Mal mit Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Der paarweise Vergleich zwischen den unterschiedlichen Kokulturen wurde mit dem Student's *t*-Test durchgeführt. A – Abort; T_R – CD4⁺CD25⁺ T_{reg}-Zellen. * = *p* < 0,05; ** = *p* < 0,01; *** = *p* < 0,001; **** = *p* < 0,0001.

T_{reg}-Zellen aus dem Thymus zeigten im Vergleich zu den CD4⁺CD25⁺ T_{reg}-Zellen aus Milz und Lymphknoten keinen so starken suppressiven Effekt auf die CD4⁺CD25⁻ Effektor T-Zellen (Abb.65). Des Weiteren konnten keine Unterschiede in der suppressiven Aktivität zwischen T_{reg}-Zellen aus den hCG-behandelten Abortmäusen und den T_{reg}-Zellen aus den PBS-behandelten Abortmäusen festgestellt werden, so dass die Gabe von hCG die Funktion der T_{reg}-Zellen nicht zu beeinflussen scheint (Abb.65).

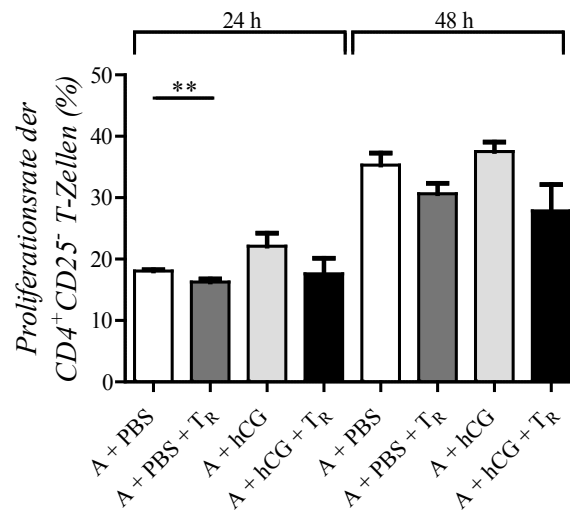


Abb. 65: Die *in vivo* Applikation von 10 IU/ml hCG konnte die suppressive Kapazität der T_{reg}-Zellen aus dem Thymus gegenüber den Effektor T-Zellen nicht erhöhen. Beide Zelltypen wurden aus dem Thymus isoliert. Zur Ermittlung der Proliferationsrate wurden die CD4⁺CD25⁻ Effektor T-Zellen mit dem Farbstoff CFDA-SE gefärbt. Der prozentuale Anteil an proliferierten Effektor T-Zellen bezogen auf die Gesamtzahl Effektor T-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. T_{reg}-Zellen aus dem Thymus PBS-behandelter Abortmäuse konnten die Proliferation der CD4⁺CD25⁻ Effektor T-Zellen nach 24 Stunden signifikant hemmen. Im Gegensatz dazu konnte die Proliferation der CD4⁺CD25⁻ Effektor T-Zellen nach hCG-Behandlung nur leicht gehemmt werden. Keine Unterschiede konnten zwischen hCG- und PBS-Behandlung nachgewiesen werden. Die Proliferationsassays wurden mindestens drei Mal mit Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Der paarweise Vergleich zwischen den unterschiedlichen Kokulturen wurde mit dem Student's *t*-Test durchgeführt. A – Abort; T_R – T_{reg}-Zellen. ** = *p* < 0,01.

Zusammenfassend wurden in der vorliegenden Arbeit die Mechanismen und Faktoren, die der Genierung, Migration und Funktion der T_{reg}-Zellen in der Schwangerschaft zu Grunde liegen, eingehender untersucht. Im ersten Versuchsteil konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an T_{reg}-Zellen während des Estruszyklus in der Maus variierte, wobei der Anteil an T_{reg}-Zellen während der empfänglichen Phase, im Estrus, am höchsten war. Es kann vermutet werden, dass die erhöhte Anzahl an T_{reg}-Zellen zum Zeitpunkt der Insemination eine frühe Erkennung von väterlichen Antigenen durch T_{reg}-Zellen begünstigt und zur Vorbereitung des mütterlichen Immunsystems auf die Implantation des Embryos beiträgt. Im zweiten Versuchsteil konnte an Hand von *in vivo* und *in vitro* Versuchen nachgewiesen werden, dass (1) Bestandteile des Ejakulats und hierbei vor allem der Samenblasenflüssigkeit den frühen Anstieg der T_{reg}-Zellen in der Schwangerschaft bedingen und dass (2) das in der Samenblasenflüssigkeit

enthaltene anti-inflammatorische Zytokin TGF- β die Expansion der T_{reg}-Zellen unterstützt. Diese Ergebnisse befürworten eine Alloantigen-vermittelte Expansion der T_{reg}-Zellen während der frühen Schwangerschaft, die darüber hinaus durch TGF- β begünstigt wird. Der dritte Versuchsteil konzentrierte sich auf die Untersuchung des Effektes des Schwangerschaftshormones hCG auf die T_{reg}-Zellen. Es konnte belegt werden, dass hCG einen entscheidenden Einfluss auf T_{reg}-Zellen im Verlauf der Schwangerschaft hat. *In vitro* Versuche mit menschlichen Proben konnten deutlich zeigen, dass **(1)** hCG die Migration von T_{reg}-Zellen zu Trophoblasten vermittelt und **(2)** hCG zur Konvertierung von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in T_{reg}-Zellen beiträgt. Darüber hinaus konnten weiterführende *in vivo* Versuche im Mausabortmodell den Einfluss des hCG auf die T_{reg}-Zellen bestätigen. Im Besonderen konnte gezeigt werden, dass die Applikation von 10 IU/ml hCG **(1)** das Auftreten von Aborten in Abortweibchen verhindert **(2)** einen systemischen und lokalen Anstieg an T_{reg}-Zellen in normal schwangeren Mäuseweibchen und Abortweibchen hervorruft **(3)** die direkte *de novo* Generierung von T_{reg}-Zellen unterstützt **(4)** einen tolerogenen Phänotyp von dezidualen DZ fördert und somit indirekt die Generierung von T_{reg}-Zellen begünstigt sowie **(5)** die suppressive Kapazität der T_{reg}-Zellen erhöht. HCG beeinflusst demnach die Generierung, Migration und Funktion der T_{reg}-Zellen und trägt entscheidend zum erfolgreichen Verlauf der Schwangerschaft bei.

5 Diskussion

Die meisten Frauen erleben ihre Schwangerschaft bis hin zur Geburt eines gesunden Kindes als eine glückliche Zeit. Dennoch treten in ungefähr 15 % aller Schwangerschaften Komplikationen wie Fehlgeburten oder Präeklampsien auf. Bei wiederholt auftretenden Fehlgeburten leiden die Frauen oft unter einer hohen psychischen Belastung, die zumeist zu einer Veränderung ihrer gesamten Lebenssituation führt. Aus wissenschaftlicher Sicht stellt die Schwangerschaft eine besondere Herausforderung für das mütterliche Immunsystem dar. Einerseits müssen mütterliche Immunzellen während der Schwangerschaft in der Lage sein, Infektionen durch Fremdorganismen erfolgreich abzuwehren, andererseits aber auch, das fremde Gewebe der *semiallogenen* Feten und ihren Plazenten zu tolerieren. Bei Fehlfunktionen des mütterlichen Immunsystems kann es daher leicht zum Auftreten von akuten Infektionen oder zur Abstoßung des Feten kommen. Mütterliche alloreaktive T-Zellen und andere Immunzellen erkennen die väterlichen Antigene des Feten und können eine fetale Abstoßung hervorrufen. Infolgedessen hat sowohl der Fetus selbst als auch das mütterliche Immunsystem Strategien entwickelt, die Immunantworten der Mutter während der Schwangerschaft zu modulieren und somit aktiv zur Akzeptanz des Feten beizutragen. Als ein entscheidender Mechanismus zur Entstehung und Aufrechterhaltung der fetalen Toleranz wird die Expansion von $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T_{reg}-Zellen während der Schwangerschaft angesehen. Diese spezielle T-Zellsubpopulation scheint die schädigenden Antworten gegenüber dem Fetus durch direkte und indirekte Wechselwirkungen mit anderen Immunzellen zu unterdrücken. Trotz intensiver wissenschaftlicher Untersuchungen sind jedoch die genauen Faktoren und Mechanismen die den Anstieg der T_{reg}-Zellen bewirken und zu ihrer protektiven Funktion beitragen noch weitgehend ungeklärt. Ziel dieser Arbeit war es, zur Aufklärung der mit T_{reg}-Zellen assoziierten Toleranzmechanismen während der Schwangerschaft beizutragen. Im Besonderen wurde hierbei untersucht, inwieweit die Anzahl an T_{reg}-Zellen schon vor der Schwangerschaft in verschiedenen Organen der Mutter variiert. Der beobachtete zyklische Anstieg und Abfall der T_{reg}-Zellen während des Estruszyklus lässt dabei vermuten, dass sich das mütterliche Immunsystem aktiv auf eine mögliche Schwangerschaft vorbereitet. Ausgehend von der Annahme, dass T_{reg}-Zellen antigenspezifisch sind und sehr früh in der Schwangerschaft expandieren, wurde des Weiteren analysiert, ob und welche Bestandteile des männlichen Ejakulats zu einem Anstieg der T_{reg}-Zellen in der frühen Schwangerschaft führen. *In vivo* Versuche konnten zeigen, dass sowohl die Anwesenheit von väterlichen Spermiantigenen als auch von Antigenen der Samenblasenflüssigkeit im Ejakulat notwendig ist, um eine T_{reg}-Zellexpansion in der frühen Schwangerschaft zu gewährleisten. Weiterführende *in vitro* Versuche wiesen darüber hinaus nach, dass das in der Samenblasenflüssigkeit enthaltene TGF- β die T_{reg}-

Zellexpansion begünstigt. Des Weiteren wurde der Effekt des Schwangerschaftshormons hCG auf die Generierung, Expansion, Migration und Funktion der T_{reg}-Zellen im Verlauf der Schwangerschaft beim Menschen und bei der Maus untersucht. Hier konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass hCG die Migration der T_{reg}-Zellen zur fetal-mütterlichen Grenzfläche bewirkt und außerdem entscheidend zur Entstehung und Funktion der T_{reg}-Zellen lokal beiträgt. Der positive Effekt des hCG auf die T_{reg}-Zellen konnte die fetale Abstoßung verhindern, was die Bedeutung des Einflusses von hCG auf die T_{reg}-Zellen für eine erfolgreiche Schwangerschaft unterstreicht.

5.1 Der beobachtete Anstieg an T_{reg}-Zellen zum Zeitpunkt der Empfängnis kann als Vorbereitung auf eine mögliche Schwangerschaft angesehen werden

Sowohl in Menschen als auch in Mäusen gibt es Hinweise auf Hormon-regulierte Schwankungen in uterinen T_{reg}-Zellpopulationen. So konnten Arruvito und Kollegen eine Expansion an CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T_{reg}-Zellen im peripheren Blut während der späten Lutealphase des Menstrualzyklus in Frauen nachweisen, wenn hohe Mengen an Östrogen im Serum vorlagen^[255]. Östrogen könnte sich demnach direkt auf die T_{reg}-Zellproliferation und ihre suppressive Funktion auswirken und zu den beobachteten Zyklusphasen-abhängigen Schwankungen beitragen^[274]. Polanczyk und Kollegen zeigten, dass die Gabe von 17-β-Östradiol in ovariectomierten Mäusen eine Erhöhung der T_{reg}-Zellanzahl und der foxp3 mRNA-Expression bewirkt. Dieselben Autoren wiesen außerdem nach, dass Östradiol *in vitro* die Foxp3-Expression in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen induziert^[271]. Da der Estruszyklus in der Maus hormonellen Schwankungen unterliegt, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht, ob T_{reg}-Zellen während des Estruszyklus in der Maus in ihrer Zellzahl variieren. Hierfür wurde die Anzahl an T_{reg}-Zellen in allen vier Phasen des Estruszyklus bestimmt. Die Ergebnisse konnten zeigen, dass die Anzahl an T_{reg}-Zellen vom Diestrus zum Estrus hin signifikant anstieg, im Estrus (empfängliche Phase) ihren Höhepunkt erreichte und zum Metestrus hin wieder abfiel. Die phasenabhängige Variation der T_{reg}-Zellanzahl konnte sowohl in der Vaginalflüssigkeit, als auch direkt im Uterus und in den lokalen Lymphknoten nachgewiesen werden. Demnach zeigt jeder reproduktive Zyklus eine relative Expansion von T_{reg}-Zellen, was vermuten lässt, dass dies zur Generierung eines erhöhten T_{reg}-Zellpools beiträgt, bei dem T_{reg}-Zellen aus der Vagina und den lokalen Lymphknoten zum Uterus rekrutiert werden können. Die gleichfalls im Uterus beobachteten zyklischen Schwankungen lassen darüber hinaus annehmen, dass bereits zum Zeitpunkt der Insemination T_{reg}-Zellen an der späteren Kontaktzone zwischen Mutter und Kind als Vorbereitung auf eine mögliche Schwangerschaft bereitgestellt werden. Die Notwendigkeit der frühen Bereitstellung von T_{reg}-Zellen für den Schwangerschaftserfolg konnte von

unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass der Transfer von T_{reg}-Zellen in die Mausabortkombination an den Schwangerschaftstagen 0, 1 oder 2 erfolgen muss, um den Abort zu verhindern. Der Transfer von T_{reg}-Zellen an den Schwangerschaftstagen 4 oder 5 hatte keinen protektiven Effekt auf die Abortrate^[172]. Unsere Beobachtungen in der Maus konnten auch von anderen Forschergruppen bestätigt werden. So zeigten Robertson und Kollegen, dass die Anzahl an T_{reg}-Zellen in den paraaortischen und mesenterischen Lymphknoten zum Zeitpunkt des Estrus signifikant erhöht ist^[272]. Kallikourdis und Betz wiesen eine erhöhte uterine foxp3 mRNA-Expression im Estrus nach und nahmen daraufhin eine Akkumulation von T_{reg}-Zellen in dieser Phase des Estruszyklus an^[273]. Weiterhin vermuteten die Autoren, dass die Erhöhung der T_{reg}-Zellanzahl durch eine Östrogen-induzierte Expression verschiedener Chemokine hervorgerufen wird, die mit dem Chemokinrezeptor CCR5 auf den T_{reg}-Zellen interagieren und eine Migration der T_{reg}-Zellen zum Uterus bedingen. Dennoch ist es wichtig in Betracht zu ziehen, dass T_{reg}-Zellen durch Antigene aktiviert werden müssen, um ihre volle suppressive Kapazität zu erlangen. Daher erscheint die alleinige Anwesenheit von Östrogen unzureichend, um T_{reg}-Zellen für die Schwangerschaft zu aktivieren und es ist eher davon auszugehen, dass die zyklusabhängigen Schwankungen die Grundlage für eine ausreichende Stimulation der T_{reg}-Zellen mit schwangerschaftsassoziierten Antigenen bilden.

5.2 Bestandteile des Ejakulats bedingen einen Anstieg an antigenspezifischen T_{reg}-Zellen in der frühen Schwangerschaft

Während der Schwangerschaft sind mütterliche T-Zellen in der Lage väterliche MHC-Antigene zu erkennen und auf sie zu reagieren. Für die normal verlaufende Schwangerschaft ist es daher von entscheidender Bedeutung, dass es Mechanismen gibt, die die schädlichen Effektorantworten der mütterlichen T-Zellen gegenüber dem Fetus limitieren und somit eine fetale Abstoßung verhindern^{[37][275][276]}. Ein Schlüsselmechanismus während der frühen Schwangerschaft stellt der systemische und lokale Anstieg an T_{reg}-Zellen dar, der eine Modulierung von alloreaktiven Immunantworten zum Zeitpunkt der Implantation des Trophoblasten in das mütterliche Endometrium ermöglichen soll. Derzeitig geht man davon aus, dass sowohl antigenunabhängige als auch antigenabhängige Mechanismen diese frühe Expansion der T_{reg}-Zellen bewirken. Eine *in vitro* Studie von Tai und Kollegen konnte zeigen, dass Hormone die Konversion von naiven T-Zellen in T_{reg}-Zellen unterstützen und somit zu ihrer Expansion beitragen^[179]. Dagegen wiesen Zhao und Kollegen nach, dass weder Östrogen noch Progesteron einen Einfluss auf die T_{reg}-Zellanzahl in ovariektomierten Mäusen haben und gehen eher von einer Alloantigen-getriebenen Expansion der T_{reg}-Zellen aus^[178]. Diese Annahme wird durch die erhöhten Anzahlen

an T_{reg} -Zellen in allogenen Schwangerschaften gegenüber syngen Schwangerschaften verstärkt^{[178][277]}. Unsere Arbeitsgruppe beobachtete, dass nur der Transfer von T_{reg} -Zellen aus schwangeren Mäusen, jedoch nicht der aus nicht schwangeren Mäusen den Feten vor einer Abstoßung schützen kann, was eine Aktivierung von T_{reg} -Zellen durch väterliche Antigene nahelegt. Des Weiteren bewirkte die Vakzinierung von CBA/J-Weibchen mit BALB/c- ($H2^d$) Antigenen vor ihrer Verpaarung mit DBA/2J-Männchen ($H2^d$; Abortverpaarung) eine Reduktion der Abortrate und gleichzeitig einen Anstieg der T_{reg} -Zellanzahl^[136]. Weitere Hinweise für eine antigenspezifische Funktionsweise der T_{reg} -Zellen stammen von Aluvihare und Kollegen, die herausfanden, dass in Abwesenheit von $CD25^+$ T-Zellen allogene, jedoch nicht syngene, Feten abgestoßen werden^[171]. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Darasse-Jéze und Kollegen, die beobachteten, dass *semiallogene* Schwangerschaften in Mäusen eine Expansion von T_{reg} -Zellen induzieren^[278]. Dieselben Autoren wiesen nach, dass eine Depletion der T_{reg} -Zellen, durch die Gabe eines anti-CD25 AK zu einer Expansion von aktivierten $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen führt und in einer fetalen Abstoßung endet^[278]. Unsere Arbeitsgruppe konnte darüber hinaus zeigen, dass die Gabe eines anti-CD25 AK vor einer allogenen Verpaarung die Implantation beeinträchtigt^[172]. Obwohl diese Erkenntnisse Hinweise auf eine Antigen-getriebene Expansion der T_{reg} -Zellen liefern, sind die genauen Antigene und Wege der Antigenpräsentation, die den Anstieg der T_{reg} -Zellen während der frühen Schwangerschaft bedingen, noch weitgehend ungeklärt. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Bestandteilen des Ejakulats (väterliche Antigene) auf die Expansion der T_{reg} -Zellen untersucht. In der Schwangerschaft ist das mütterliche Immunsystem in zwei Phasen den väterlichen Antigenen ausgesetzt – anfänglich während der Insemination durch den Kontakt mit dem Samen^[279] und später, bei der Implantation, wenn der Trophoblast in das mütterliche Endometrium eindringt^{[280][281]}. In der Präimplantationsphase können daher väterliche Alloantigene, welche im Samen enthalten sind, zur Expansion des T_{reg} -Zellpools führen, bevor fetale Antigene, die nach der Implantation präsentiert werden, zur Aufrechterhaltung des T_{reg} -Zellpools beitragen. Es konnte gezeigt werden, dass das Immunsystem der Mutter während der gesamten Schwangerschaft fetalen Zellen und somit den väterlichen Antigenen ausgesetzt ist, da diese Zellen nachweislich im Körper der Mutter zirkulieren^{[35][181]}. Hier wurde geklärt, welche Bedeutung den einzelnen Bestandteilen des männlichen Ejakulats (Spermien und/oder Samenblasenflüssigkeit) bei der Expansion der T_{reg} -Zellen zukommt. Verpaarungen von CBA/J-Weibchen mit entweder intakten, vasktomierten (ohne Spermien) oder samenblasendefizienten (ohne Samenblasenflüssigkeit) BALB/c-Männchen konnten zeigen, dass das Fehlen von Spermien und der Samenblasenflüssigkeit den Anstieg an T_{reg} -Zellen im Thymus beeinträchtigt. Da eine Zunahme der T_{reg} -Zellanzahl im Thymus schon sehr früh in der Schwangerschaft beobachtet werden kann^[173], wäre auf Grund der Ergebnisse zu vermuten,

dass väterliche Antigene der Spermien oder der Samenblasenflüssigkeit zu diesem Anstieg beitragen. Entsprechend den Beobachtungen im Thymus konnte auch einen Effekt von väterlichen Antigenen des Ejakulats auf die T_{reg} -Zellexpansion in den lokalen Lymphknoten nachgewiesen werden. Allerdings scheinen im Vergleich zum Thymus die Spermien hier keinen entscheidenden Einfluss auf die T_{reg} -Zellerhöhung zu haben. Robertson und Kollegen konnten ebenfalls einen Anstieg von $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T_{reg} -Zellen in paraaortischen Lymphknoten nach Verpaarung mit intakten Männchen belegen. Dieser Anstieg war beeinträchtigt, wenn die Männchen entweder vasktomiert oder samenblasendefizient waren^[272]. Da die Hormonlevel in Weibchen nach Verpaarung mit intakten oder operierten Männchen am Tag 3,5 der Schwangerschaft vergleichbar waren^[282], schlossen die Autoren aus, dass Hormonparameter der frühen Schwangerschaft die hohen T_{reg} -Zellzahlen bis zum Zeitpunkt der Implantation bedingen^[272]. Weitere Studien konnten zeigen, dass die Insemination zu einer Hypertrophie in den lokalen Lymphknoten führt^{[283][284]}. Diese physiologische Veränderung geht mit der Expression von Lymphozyten-Aktivierungsmarkern und einer erhöhten Zytokinexpression einher und ist vollständig von Faktoren abhängig, die im Samenblasenplasma enthalten sind^[285]. Diese Daten bekräftigen unsere Ergebnisse einer durch Bestandteile des Samens hervorgerufenen Expansion der T_{reg} -Zellen im Thymus und den lokalen Lymphknoten und widersprechen einem Hormon-bedingten Anstieg. Erhärtet wird diese Annahme durch Ergebnisse, die aus der *in vitro* Behandlung der T_{reg} -Zellen mit Samenblasenflüssigkeit gewonnen werden konnten. Unsere Daten konnten zeigen, dass die Behandlung von T_{reg} -Zellen mit Samenblasenflüssigkeit zur verstärkten Proliferation der T_{reg} -Zellen gegenüber unbehandelten T_{reg} -Zellen führte. Dabei ließen sich in allen Versuchsansätzen keine Unterschiede zwischen den beiden verschiedenen Verdünnungen der Samenblasenflüssigkeit nachweisen, was darauf hinweisen könnte, dass schon geringere Konzentrationen der Samenblasenflüssigkeit für eine Stimulation der T_{reg} -Zellen ausreichend sind. Darüber hinaus konnte zu keinem Zeitpunkt ein Effekt der Samenblasenflüssigkeit auf die Proliferation der Effektor T-Zellen nachgewiesen werden, sodass davon auszugehen ist, dass die in der Samenblasenflüssigkeit enthaltenen Faktoren eine Expansion der T_{reg} -Zellen gegenüber den Effektor T-Zellen begünstigen, aber keine Suppression der Effektor T-Zellen bewirken.

Sowohl in Menschen als auch in Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Samenblasenflüssigkeit eine entzündungsähnliche Reaktion im weiblichen Reproduktionstrakt hervorruft, die eine Rekrutierung von DZ in endometriales und zervikales Gewebe bewirkt^{[89][286][287]}. Lösliche Faktoren in der Plasmafraktion der Samenblasenflüssigkeit induzieren die Expression von proentzündlichen Zytokinen und Chemokinen in Epithelzellen, die den Gebärmutterhals und den Uterus auskleiden. Dieser Vor-

gang bedingt eine Infiltration von Makrophagen, DZ und Granulozyten, die sich im Endometrium und der Dezidua anreichern^{[253][288][289]}. Die rekrutierten DZ exprimieren Marker, die auf einen tolerogenen Phänotyp hinweisen^[290] und könnten sich somit direkt an der Generierung von T_{reg}-Zellen beteiligen^[50]. Kürzlich veröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe konnten die Anwesenheit von väterlichen Antigenen bei mit GFP⁺-transgenen Männchen verpaarten Wildtypweibchen in den Lymphknoten, der Milz und dem Blut neben weiteren Organen während der frühen, mittleren und späten Schwangerschaft nachweisen^[49]. Darüber hinaus konnten väterliche Antigene im Vaginallumen unmittelbar nach der Insemination festgestellt werden. Die Anwesenheit von väterlichen Antigenen und DZ unmittelbar nach der Insemination ermöglicht eine effektive Prozessierung der Antigene direkt nach Eintreten der Schwangerschaft und könnte entscheidend zur Aktivierung von T_{reg}-Zellen beitragen^[49]. Diese Annahme wird durch eine Studie von Johansson und Kollegen bekräftigt, die zeigen konnte, dass DZ in der Lage sind väterliche Antigene der Samenblasenflüssigkeit zu prozessieren und T-Zellen in den lokalen Lymphknoten zu aktivieren^[285]. Spekulativ bleibt jedoch weiterhin, ob die väterlichen Antigene auf direkten Weg durch väterliche APZ im Vaginallumen^[49] oder auf indirekten Weg durch mütterliche APZ präsentiert werden^[39]. Moldenhauer und Kollegen haben in diesem Zusammenhang demonstriert, dass mütterliche APZ Antigene aus der Samenblasenflüssigkeit kreuzpräsentieren und dadurch eine Aktivierung und Expansion von väterlichen Antigen-reaktiven CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellpopulationen bedingt wird^[39]. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass einige der väterlichen GFP⁺-Zellen, die in mütterlichen Organen detektiert werden konnten, positiv für die Oberflächenmarker CD11c und MHC II waren, was einem Phänotyp von APZ entspricht und eine direkte Präsentation von väterlichen Antigenen erlaubt. Auf Grund der Erkenntnisse unserer und anderer Arbeitsgruppen kann eine direkte und indirekte Präsentation von väterlichen Antigenen in der Präimplantationsphase angenommen werden, die den Anstieg an T_{reg}-Zellen erklären könnte.

5.3 Das in der Samenblasenflüssigkeit enthaltene anti-inflammatorische Zytokin

TGF- β begünstigt die Expansion der T_{reg}-Zellen

Die Samenblasenflüssigkeit enthält neben verschiedenen anderen Hormonen und Wachstumsfaktoren^{[291][292]} in größeren Mengen das anti-inflammatorische Zytokin TGF- β 1 und das Gewebehormon PGE₂^[256]. Der TGF- β 1-Gehalt in der Samenblasenflüssigkeit bei Mäusen beträgt ungefähr 70 ng/ml^[256]. Beim Menschen findet man hauptsächlich die Isoformen TGF- β 1 und TGF- β 3, die in einer Konzentration von ungefähr 300 ng/ml vorliegen. Das vorzugsweise in seiner latenten (inaktiven) Form in der Samenblasenflüssigkeit vorliegende TGF- β wird erst im weiblichen Reproduktions-

trakt nach der Insemination in seine aktive Form überführt. Verantwortlich dafür sind Plasmin und andere Enzyme^[293]. Sowohl für TGF- β als auch für PGE₂ konnte bereits gezeigt werden, dass sie in die durch T_{reg}-Zellen vermittelte Immunsuppression involviert sind^{[108][109]}. Schon 1985 zeigten Witkin und Kollegen, dass die Samenblasenflüssigkeit einen suppressiven Phänotyp in mononukleären Zellen im peripheren Blut induziert, der zumindest teilweise durch PGE₂ vermittelt wird^[294]. Naive CD4⁺CD25⁻ T-Zellen exprimieren Foxp3 und differenzieren sich in einen suppressiven T-Zellphänotyp, wenn TGF- β vorliegt^[134]. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass TGF- β auch in die Proliferation von reifen T_{reg}-Zellen über die Modulierung von DZ involviert ist^[295]. PGE₂ scheint in dieser Funktion mit TGF- β zusammenzuarbeiten, da PGE₂ *in vitro* die hemmende Wirkung von humanen CD4⁺CD25⁺ T_{reg}-Zellen erhöht und einen regulatorischen Phänotyp in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen induziert^[296]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit das in der Samenblasenflüssigkeit enthaltene TGF- β zur Expansion der T_{reg}-Zellen beiträgt. Um den Anteil des TGF- β an der durch die Samenblasenflüssigkeit hervorgerufenen Proliferation der T_{reg}-Zellen zu bestimmen, wurde das Zytokin mit einem AK blockiert. Es konnte beobachtet werden, dass die Proliferation der T_{reg}-Zellen nach Hemmung von TGF- β 1 vermindert war, sodass vermutet werden kann, dass das in der Samenblasenflüssigkeit enthaltene TGF- β 1 zumindest einen teilweisen Beitrag zur Expansion der T_{reg}-Zellen leistet. Diese Vermutung konnte dadurch bestätigt werden, dass die Behandlung der T_{reg}-Zellen mit rekombinantem TGF- β 1 einen signifikanten Anstieg von T_{reg}-Zellen aus BALB/c-Weibchen im Gegensatz zu unbehandelten T_{reg}-Zellen bewirkte. Interessanterweise führte die Behandlung der T_{reg}-Zellen aus CBA/J-Weibchen mit rekombinantem TGF- β 1 zu keiner Erhöhung der Proliferation der T_{reg}-Zellen. Möglicherweise wird bei diesem Mausstamm die Expansion der T_{reg}-Zellen vorzugsweise durch andere Faktoren (z.B. väterliche Antigene) bedingt und TGF- β 1 stellt nicht den Hauptfaktor für die Samenblasen-vermittelte Expansion dar. Diese Tatsache würde auch erklären, warum in CBA/J-Weibchen die Hemmung von TGF- β 1 bei gleichzeitiger Behandlung mit Samenblasenflüssigkeit keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit anti-TGF- β 1-behandelten T_{reg}-Zellen und den ohne anti-TGF- β 1-behandelten T_{reg}-Zellen bewirkte. Um den anteiligen Effekt des TGF- β auf die Expansion der T_{reg}-Zellen noch genauer zu untersuchen, wurden T_{reg}-Zellen entweder allogener oder syngener Samenblasenflüssigkeit *in vitro* ausgesetzt. Bei einem hauptsächlich durch TGF- β bedingten Anstieg der T_{reg}-Zellen würde man hier keine Unterschiede im Effekt der Samenblasenflüssigkeiten erwarten. Die Ergebnisse zeigten jedoch deutlich, dass im Gegensatz zum proliferationsfördernden Effekt der allogenen Samenblasenflüssigkeit aus den C57BL/6-Männchen auf die T_{reg}-Zellen aus BALB/c-Weibchen kein signifikanter Unterschied zwischen den unbehandelten T_{reg}-Zellen aus BALB/c-Weibchen und den T_{reg}-Zellen, die mit syngener Samenblasenflüssigkeit aus BALB/c-Männchen behandelt wurden, festgestellt werden konn-

te. Infolgedessen ist davon auszugehen, dass zusätzlich zum proliferationsfördernden Einfluss des TGF- β auf die T_{reg}-Zellen väterliche Alloantigene für eine effiziente Expansion von T_{reg}-Zellen notwendig sind.

Obwohl die gewonnenen Ergebnisse eindeutig auf einen durch die Samenblasenflüssigkeit hervorgerufenen T_{reg}-Zellanstieg hinweisen, bleibt die physiologische Bedeutung dieses Mechanismus für die erfolgreiche Schwangerschaft weiterhin im Unklaren. Embryotransferstudien könnten Klarheit darüber bringen, ob es sich um einen essentiellen oder lediglich unterstützenden Mechanismus für den Aufbau der immunologischen Toleranz gegenüber dem Fetus handelt. Erzielte Erfolge bei künstlichen Befruchtungen im Menschen sowie bei Embryotransfers in Mäusen und anderen Spezies deuten darauf hin, dass eine erfolgreiche Schwangerschaft auch ohne eine natürliche Insemination stattfinden kann. Dennoch gibt es eine Reihe von Hinweisen, dass unterstützende Reproduktionstechniken mit suboptimalen Ergebnissen assoziiert sind^[297] und dass das Fehlen von Samenblasenflüssigkeit hierfür verantwortlich sein könnte^[286]. Für den Transfer von Embryonen in Mäuse verwendet man gewöhnlich Weibchen, die zuvor mit vasektomierten Männchen verpaart wurden. Bei einem Transfer der Embryonen in Weibchen, die zuvor nicht mit Samenblasenflüssigkeit in Kontakt gekommen sind, ließen sich vermehrt Abnormalitäten der Feten und eine erhöhte fetale Abstoßungsrate feststellen^[298]. Ähnliche Beobachtungen konnten auch beim Transfer von Embryonen in Mäuseweibchen gemacht werden, die mit samenblasendefizienten Männchen verpaart wurden^[299]. Bei Ratten sind die Implantationsraten und das fetale Wachstum ebenfalls beeinträchtigt, wenn die Weibchen vor dem Transfer keiner Samenblasenflüssigkeit ausgesetzt waren^[300]. Im Menschen verweisen erste klinische Studien darauf, dass es einen Einfluss der Samenblasenflüssigkeit auf die Fertilität gibt. So konnte der Anteil von Lebendgeburten bei Paaren, die sich einer künstlichen Befruchtung unterzogen haben, signifikant gesteigert werden, wenn beide Partner zum Zeitpunkt des Embryotransfers miteinander Geschlechtsverkehr hatten^{[301][302]}. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass der Kontakt mit der männlichen Samenblasenflüssigkeit den Schwangerschaftserfolg bei Frauen mit habituellen Abortgeschehen erhöht^[303]. Bei der Schwangerschaftskomplikation Präeklampsie, die von einigen Forschern mit einer unzureichenden T_{reg}-Zellaktivität assoziiert wurde^{[166][304]}, konnte bei wiederholtem Kontakt mit männlichem Ejakulat ein positives Ergebnis erzielt werden^{[305][306]}. Einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Präeklampsie und dem Kontakt mit männlichem Samen zeigt eine Studie, in der stark erhöhte Präeklampsieraten nach Eizell- oder Spermaspende auftraten, wenn der Kontakt mit dem Spendersamen zuvor nicht stattgefunden hatte^[307]. Zudem wiesen weitere Studien nach, dass bei Frauen, die zunächst durch die Verwendung von Kontrazeptiva (Kondome, Diaphragma) den Kontakt zu Spermien und

Samenblasenflüssigkeit unterbunden hatten, später bei Kinderwunsch ein erhöhtes Risiko auftrat eine Präeklampsie zu entwickeln^{[305][308]}. Ein besseres Verständnis der Schlüsselantigene und der immunregulierenden Komponenten der Samenblasenflüssigkeit und ihrer Wirksamkeit könnte in Zukunft die Entwicklung von therapeutischen Substanzen unterstützen, Frauen mit Schwangerschaftskomplikationen und eingeschränkter Fertilität zu helfen.

Zusammenfassend lässt sich aus den gewonnenen Daten ein **hypothetisches Szenario** zur Erklärung der Antigen-getriebenen Expansion der T_{reg}-Zellen während der frühen Schwangerschaft erstellen (Abb.66):

Während der Insemination gelangen väterliche Antigene mit dem Samen (Spermien und Samenblasenflüssigkeit) in das Vaginallumen der Mutter. Hier können die Antigene den T_{reg}-Zellen, die zu diesem Zeitpunkt im Vaginallumen angereichert sind, durch väterliche APZ (direkte Präsentation) und/oder durch mütterliche APZ (indirekte Präsentation) präsentiert werden. Die Aktivierung von antigenspezifischen T_{reg}-Zellen führt zu deren Expansion. Zusätzlich wird die Erhöhung des T_{reg}-Zellpools durch das in der Samenblasenflüssigkeit vorliegende TGF- β begünstigt. Darüber hinaus sprechen verschiedene Ergebnisse dafür, dass väterliche APZ bzw. mütterliche APZ, die väterliche Antigene aufgenommen haben, zu den lokalen Lymphknoten wandern und hier eine weitere Expansion von T_{reg}-Zellen induzieren. Anschließend können T_{reg}-Zellen sowohl aus dem Vaginallumen als auch aus den lokalen Lymphknoten zum Uterus rekrutiert werden, wo sie bereits vor der Implantation schwangerschafts-assoziierte Immunantworten modulieren können. Nach der Implantation gewährleistet die kontinuierliche Freisetzung von plazentalen Antigenen und deren direkte oder indirekte Präsentation eine Aufrechterhaltung des schützenden T_{reg}-Zellpools bis zur Geburt.

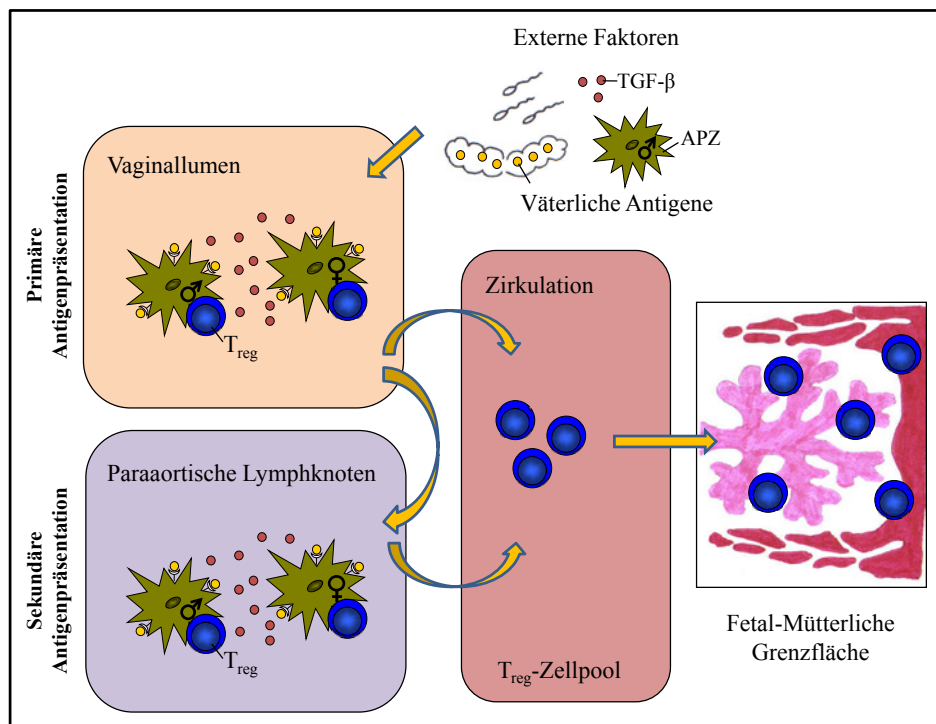


Abb. 66: Hypothetisches Szenario zur Expansion des T_{reg} -Zellpools in der frühen Schwangerschaft. Väterliche Antigene des Ejakulats gelangen während der Insemination in das mütterliche Vaginallumen, wo sie über väterliche und/oder mütterliche APZ antigenspezifischen T_{reg} -Zellen präsentiert werden. Des Weiteren gelangen väterliche Antigene als Zellbestandteile oder als ganze Zellen in die lokalen (para-aortischen) Lymphknoten, wo sie ebenfalls eine Aktivierung von antigenspezifischen T_{reg} -Zellen bewirken. Das in der Samenblasenflüssigkeit in größeren Mengen vorhandene anti-inflammatorische Zytokin TGF- β begünstigt zudem die Generierung der T_{reg} -Zellen. Die Aktivierung der T_{reg} -Zellen durch väterliche Antigene führt zur Erhöhung des T_{reg} -Zellpools, aus dem im Folgenden T_{reg} -Zellen in die fetal-mütterliche Grenzfläche rekrutiert werden können und dort zum Aufbau eines toleranten Mikromilieus beitragen. Erleichtert wird der Kontakt mit väterlichen Antigenen durch die erhöhte Anzahl an T_{reg} -Zellen, die zum Zeitpunkt der Insemination sowohl im Vaginallumen als auch in den para-aortischen Lymphknoten vorliegen.

5.4 Die Expression von hCG und T_{reg} -Zellmarkern an der fetal-mütterlichen Grenzfläche korreliert mit einem erfolgreichen Schwangerschaftsverlauf

Das Schwangerschaftshormon hCG ist für den Ablauf einer erfolgreichen Schwangerschaft unabdingbar^{[258][259]}. HCG weist viele verschiedene immunregulatorische Eigenschaften auf, die den Implantationsprozess des Feten in das mütterliche Endometrium unterstützen^{[247][309][310][311]}. Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Behandlung von peripheren mononukleären Blutzellen mit hCG und

ihr anschließender Transfer in Patientinnen zwei Tage nach erfolgtem Embryotransfer die Implantationsrate der Blastozyste erhöht^[312]. HCG wird bereits unmittelbar nach Beginn der Schwangerschaft vom Embryo produziert. Der starke Anstieg von hCG in den ersten Schwangerschaftswochen wird jedoch durch die Produktion des Synzytiotrophoblasten nach der Implantation erreicht. Da sowohl hCG als auch T_{reg}-Zellen schon sehr früh in der Schwangerschaft an der fetal-mütterlichen Grenzfläche nachweisbar sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob hCG die Migration der T_{reg}-Zellen zur Kontaktzone zwischen Mutter und Kind begünstigt und darüber hinaus eine positive Wirkung auf die Generierung der T_{reg}-Zellen vor Ort hat. Zunächst konnte bestätigt werden, dass normal schwangere Frauen des ersten Trimenons hohe hCG-Mengen auf mRNA- und Proteinebene in placentalem und deziduaem Gewebe aufweisen. Im Gegensatz dazu zeigten Patientinnen mit Schwangerschaftskomplikationen (Spontanabort oder extrauterine Schwangerschaft) signifikant geringere Mengen von hCG auf mRNA- und Proteinebene. Um zu untersuchen, ob die Menge von hCG mit der Anzahl und Funktion der T_{reg}-Zellen korreliert, wurde anschließend die mRNA-Expression von foxp3, nrp-1, IL-10 und TGF- β in denselben Proben untersucht. Foxp3 und Nrp-1 wurden als spezifische Marker für T_{reg}-Zellen^{[101][112]} beschrieben und waren in Gewebeproben von Patientinnen mit Schwangerschaftskomplikationen im Vergleich zu normal schwangeren Frauen signifikant verringert. Die Daten konnten eindeutig zeigen, dass die hCG mRNA-Menge signifikant mit der foxp3 mRNA-Menge korrelierte. Demnach sind bei Patientinnen mit Schwangerschaftskomplikationen geringe hCG-Mengen mit einer geringen Anzahl an T_{reg}-Zellen assoziiert. Ergebnisse anderer Forschergruppen konnten diese Beobachtung bestätigen^{[162][163]}. Bezüglich der Funktion der T_{reg}-Zellen konnte eine signifikant geringere IL-10-Menge und eine leicht verminderte TGF- β -Menge in Patientinnen mit Schwangerschaftskomplikationen im Vergleich zu normal schwangeren Frauen festgestellt werden. Obwohl die Produktion beider Zytokine nicht direkt in den T_{reg}-Zellen ermittelt werden konnte, lassen die Ergebnisse dennoch einen Zusammenhang zwischen der Menge an IL-10 und TGF- β und der Funktion der T_{reg}-Zellen vermuten. Verschiedene Studien konnten bereits zeigen, dass T_{reg}-Zellen ihre schützende Funktion an der fetal-mütterlichen Grenzfläche über die Sekretion von IL-10 und TGF- β vermitteln^{[136][188][313]}. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Mangel beider Zytokine bei Frauen mit Schwangerschaftskomplikationen auf eine beeinträchtigte Funktion anderer Immunzellen hinweist.

5.5 HCG bewirkt die Migration der T_{reg}-Zellen zu Trophoblastzellen

Die Beobachtung, dass die Menge von hCG und die Anzahl an T_{reg}-Zellen an der fetal-mütterlichen Grenzfläche positiv korrelieren und die Tatsache, dass hCG als ein Chemoattraktant für andere Zellen beschrieben wurde, ließ vermuten, dass hCG einen möglichen Attraktor für T_{reg}-Zellen zur Kontaktzone zwischen Mutter und Kind darstellt. Bei einer Chemokin-vermittelten Attraktion exprimieren die T_{reg}-Zellen Chemokinrezeptoren, die mit ihren entsprechenden Chemokinliganden interagieren und die T_{reg}-Zellen befähigen entlang eines Chemokingradienten zu migrieren. Entsprechend dieser Form der T_{reg}-Zellmigration ist es auch bei einer Anlockung durch hCG erforderlich, dass die T_{reg}-Zellen den LH/CG-Rezeptor exprimieren, um für die Attraktion empfänglich zu sein. Daher wurde zunächst überprüft, ob T_{reg}-Zellen von normal schwangeren Frauen den LH/CG-Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren. An Hand der gewonnenen Daten konnte gezeigt werden, dass die aus normal schwangeren Frauen isolierten T_{reg}-Zellen mehrere LH/CG-Rezeptormoleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren. In Übereinstimmung damit hat eine ältere Studie die Expression des LH/CG-Rezeptors auf humanen Suppressor T-Zellen nachgewiesen^[250]. Allerdings war zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Studie eine eindeutige Charakterisierung der Suppressor T-Zellen an Hand von T_{reg}-Zellmarkern wie CD25 und Foxp3 nicht möglich. Nachdem bestätigt werden konnte, dass T_{reg}-Zellen grundsätzlich für eine hCG-vermittelte Attraktion zur fetal-mütterlichen Grenzfläche empfänglich sind, wurde mittels eines 2-Kammer-Transwell-Systems die Migration der T_{reg}-Zellen zu hCG-produzierenden Trophoblasten untersucht. Eine Migration von T_{reg}-Zellen zu Primärtrophoblasten und Choriokarzinomzellen (JEG-3) konnte eindrucksvoll gezeigt werden, was die Annahme einer hCG-vermittelten Attraktion zur fetal-mütterlichen Grenzfläche unterstützt. In einem weiterführenden Experiment konnte unter Verwendung eines 3D-Kollagenmatrixassays eine aktive Migration der T_{reg}-Zellen zu JEG-3-Zellen nachgewiesen werden. Dennoch konnte zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass T_{reg}-Zellen zusätzlich durch andere Moleküle wie beispielsweise Chemokine attrahiert werden, die in größeren Mengen von Trophoblasten gebildet und sezerniert werden^{[314][315][316][317]}. Infolgedessen wurden weitere Versuche durchgeführt, um die Hypothese einer hCG-vermittelten Attraktion zu untermauern. Eine Migration von T_{reg}-Zellen zu Keratinozyten (HaCat), welche kein hCG produzieren und als Kontrollzellen im Assay eingesetzt wurden, konnte ausgeschlossen werden. Da Trophoblasten jedoch Faktoren sezernieren, die ebenfalls eine Attraktion von T_{reg}-Zellen bewirken können und nicht von HaCat-Zellen gebildet werden, wurden zur weiteren Bestätigung einer hCG-vermittelten T_{reg}-Zellattraktion Darmkrebszellen (HCT116), die kein hCG sezernieren, mit hCG-Vektoren transfiziert. Nach der Transfektion der HCT116-Zellen mit zwei verschiedenen β -Untereinheiten des hCG mit oder ohne die zugehöri-

ge α -Untereinheit, exprimierten die HCT116-Zellen hohe Mengen an hCG. Die Expression der rekombinanten β -Untereinheiten mit oder ohne α -Untereinheit begünstigte die Migration der T_{reg} -Zellen verglichen mit den Kontroll-transfizierten HCT116-Zellen. Dabei ließ sich kein Unterschied zwischen der $\beta 3$ - und $\beta 7$ -hCG-Untereinheit feststellen, obwohl die vorherrschenden β -Untereinheiten in der Schwangerschaft 3, 5 und 8 sind^[202]. Die Ergebnisse konnten zudem zeigen, dass die Transfektion mit der hCG- α -Untereinheit alleine ausreichend ist, um eine Attraktion der T_{reg} -Zellen zu bewirken. Diese Beobachtung schließt natürlich die Möglichkeit ein, dass auch andere Hormone wie LH, FSH und TSH, die dieselbe α -Untereinheit wie hCG tragen, ebenfalls T_{reg} -Zellen attrahieren können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Attraktion der T_{reg} -Zellen zu diesen Hormonen jedoch nicht analysiert und wird Bestandteil zukünftiger Untersuchungen sein. Die hohen Mengen an sezerniertem hCG, die nach der Transfektion der HCT116-Zellen erreicht werden konnten, ermöglichen die Bildung von hCG-Homodimeren (hCG β/β oder hCG α/α). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass hCG- β -Untereinheiten oder hCG- α -Untereinheiten natürlicherweise Homodimere bilden können. Beide Homodimere (hCG β/β und hCG α/α) können die Signaltransduktion in LH/CG-Rezeptor-tragenden Zellen in gleichem Maße wie hCG-Heterodimere stimulieren^{[318][319][320][321]}. Demnach kann vermutet werden, dass die beobachtete Migration der T_{reg} -Zellen zu den β/β - oder α/α -Homodimeren nach der Homodimerisierung der identischen Untereinheiten mit anschließender Aktivierung des LH/CG-Rezeptors auf den T_{reg} -Zellen zustande kommt. Außerdem konnte festgestellt werden, dass der prozentuale Anteil der T_{reg} -Zellmigration zu den Trophoblasten höher war, als zu den hCG-transfizierten HCT116-Zellen. Daher muss in Zukunft geklärt werden, welche Faktoren, die neben dem hCG von den Trophoblasten gebildet werden, zur Attraktion der T_{reg} -Zellen beitragen. Als weiteren Nachweis einer hCG-vermittelten Attraktion von T_{reg} -Zellen wurden hCG-produzierende JEG-3-Zellen mit siRNA gegen hCG behandelt. Leider konnte durch die siRNA-Behandlung nur ein knock-down der hCG-Sekretion von maximal 40% erreicht werden. Der geringe knock-down ließ sich auf die mRNA-Sequenz des hCG zurückführen, die die Synthese von spezifischen hCG-siRNAs auf Grund der vielen CG-Basenwiederholungen erschwerte. Trotz des verhältnismäßig geringen knock-down der hCG-Sekretion konnte eine verminderte Migration der T_{reg} -Zellen zu den behandelten JEG-3-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten JEG-3-Zellen festgestellt werden und zwar in gleichem Maße wie der knock-down der hCG-Sekretion. Als Alternative zur siRNA-Behandlung wäre der Einsatz eines neutralisierenden AK denkbar. Allerdings ist derzeit kein neutralisierender AK gegen hCG kommerziell erhältlich, sodass entsprechende Versuche erst in Zukunft durchgeführt werden können. Eine *in vivo* Studie konnte zeigen, dass die Gabe von hCG das Ausbrechen von autoimmunbedingten Diabetes in NOD-Mäusen verhindern konnte^[260]. Die hCG-Applikation bewirkte einen signifikanten Anstieg an

T_{reg}-Zellen in der Milz und in den der Bauchspeicheldrüse benachbarten Lymphknoten. Der T_{reg}-Zellanstieg war zudem mit einer erhöhten Menge an IL-10 und TGF- β assoziiert. Die Autoren vermuteten, dass hCG eine Attraktion von T_{reg}-Zellen zum Entzündungsherd verursachte, wodurch Immunantworten von Effektor T-Zellen unterdrückt werden konnten und der Ausbruch der Krankheit verhindert wurde^[260]. Ein ähnliches Szenario wäre für den Implantationsprozess vorstellbar. Die gewonnenen Daten unterstützen die Annahme, dass T_{reg}-Zellen bereits vor und zum Zeitpunkt der Implantation zur fetal-mütterlichen Grenzfläche angelockt werden, um die inflammatorischen Vorgänge während der Einnistung der Blastozyste zu regulieren^{[322][323][324]}. Schon 1985 konnten Suppressor T-Zellen in der humanen Dezidua nachgewiesen werden^[325], aber erst kürzlich ermöglichte die Verfügbarkeit weiterer T_{reg}-Zellmarker die Anwesenheit von CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T_{reg}-Zellen in deziduaalem Gewebe zu bestätigen^{[326][327][328][329]}. Es ist bekannt, dass der für die T_{reg}-Zellen wichtige Proliferations- und Überlebensfaktor IL-2 nicht an der fetal-mütterlichen Grenzfläche im Menschen und der Maus produziert und exprimiert wird^{[266][267][268]}. Daher kann man davon ausgehen, dass T_{reg}-Zellen nicht direkt vor Ort expandieren, sondern zur Dezidua migrieren müssen, nachdem sie in lymphoiden Geweben generiert wurden. Diese Annahme wird durch Daten, die im Maussystem erhoben wurden, unterstützt^{[106][134]}. Des Weiteren wurde beschrieben, dass nach der Insemination Makrophagen und Lymphozyten, welche hCG sezernieren, das Endometrium infiltrieren. Diese Zellen könnten auf Grund ihrer hCG-Sekretion zur Attraktion der T_{reg}-Zellen zur fetal-mütterlichen Grenzfläche beitragen^{[330][331][332]}. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass hCG die Produktion von IL-8 in Monozyten anregt^[333]. Das Zytokin kann im Folgenden eine Attraktion von Lymphozyten bewirken^[334]. In einer weiteren Studie wurde nachgewiesen, dass hCG bereits in sehr geringen Konzentrationen Neutrophile, Monozyten und Lymphozyten anlocken kann^[335]. Welcher Zelltyp dabei bevorzugt zur Migration angeregt wurde, war abhängig vom hCG-Konzentrationsgradienten^[335]. HCG kann daher neben seiner endokrinen Funktion eine wichtige Rolle bei der Migration von Immunzellen zugeschrieben werden. Im Speziellen konnte im Rahmen dieser Arbeit mittels menschlicher Proben gezeigt werden, dass hCG die Migration der T_{reg}-Zellen zur Plazenta vermittelt.

5.6 Das von Trophoblasten sezernierte hCG bewirkt eine *de novo* Generierung von T_{reg}-Zellen aus naiven T-Zellen

Die gewonnenen Daten lassen vermuten, dass hCG einen Einfluss auf die *de novo* Generierung von T_{reg}-Zellen aus naiven T-Zellen hat. Die Kokultivierung von naiven CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus schwangeren Frauen mit hCG-produzierenden Primärtrophoblasten und JEG-3-Zellen erbrachte im Vergleich

zur Kokultivierung mit nicht-hCG-produzierenden HaCat-Zellen eine signifikant höhere *de novo* Generierung von T_{reg}-Zellen, die sich an Hand von T_{reg}-Zellmarkern wie CD25, CTLA-4 und Foxp3 bestimmen ließ. Dennoch konnte auch nach Kokultivierung mit nicht-hCG-produzierenden HaCat-Zellen eine Konvertierung von naiven T-Zellen in T_{reg}-Zellen beobachtet werden. Da es sich bei HaCat-Zellen um Krebszellen handelt, ist zu vermuten, dass diese Zellen Faktoren sezernieren, die eine Anreicherung von T_{reg}-Zellen bewirken. Verschiedene Studien konnten bereits zeigen, dass T_{reg}-Zellen sich spezifisch in der Nähe von Tumoren ansiedeln und eine Tumorabstoßung verhindern^{[336][337][338]}. Übereinstimmend mit den gewonnenen Daten konnten bereits frühere Versuche mit menschlichen Proben und Mausproben zeigen, dass die Anwesenheit von hCG zur Induktion von Suppressor T-Zellen führt, die daraufhin eine Mitogen-induzierte Aktivierung von B-Zellen verhindern konnten^{[246][270]}. Allerdings konnte zum damaligen Zeitpunkt auf Grund des methodischen Kenntnisstandes noch keine genaue Charakterisierung der Suppressor T-Zellen vorgenommen werden, sodass nur vermutet werden kann, dass hCG in diesen Versuchen die Generierung von T_{reg}-Zellen bewirkt hat. Neben einer hCG-vermittelten Konvertierung von naiven T-Zellen in T_{reg}-Zellen, konnte auch für andere schwangerschaftsassozierte Hormone ein Einfluss auf die Generierung von T_{reg}-Zellen und deren Funktion nachgewiesen werden. So konnten Prieto und Kollegen zeigen, dass physiologische Mengen an Östradiol, bei gleichzeitiger Aktivierung der humanen T_{reg}-Zellen über ihren T-Zellrezeptor, eine Proliferation der T_{reg}-Zellen begünstigen^[274]. Entsprechende Beobachtungen konnten auch von Tai und Kollegen in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Mausmodellen gemacht werden. Die Autoren zeigten, dass Östradiol nicht nur zur Expansion der T_{reg}-Zellen in verschiedenen Geweben beiträgt, sondern auch deren Foxp3- und IL-10 Expression erhöht und somit einen direkten Einfluss auf ihre Funktion hat^[179]. Dieselben Autoren konnten die Expression des Östrogenrezeptors auf CD4⁺CD25⁻ T-Zellen nachweisen und vermuten daher, dass Östradiol eine direkte Generierung von T_{reg}-Zellen aus CD4⁺CD25⁻ T-Zellen bewirkt. Folglich scheinen verschiedene Hormone während der Schwangerschaft die Entstehung von T_{reg}-Zellen zu unterstützen.

5.7 Die fetale Abstoßung im Mausabortmodell kann durch eine hCG-vermittelte Erhöhung der T_{reg}-Zellanzahl verhindert werden

Um die schützende Funktion des hCG durch Anreicherung von T_{reg}-Zellen an der fetal-mütterlichen Grenzfläche zu bestätigen und die zu Grunde liegenden Mechanismen genauer zu untersuchen, wurden weiterführende Experimente in Mäusen durchgeführt. Mäuse eignen sich auf Grund der Expression des LH/CG-Rezeptors, der das humane CG effektiv binden kann, als gutes Modell, um die Wir-

kung des hCG auf die Schwangerschaft zu untersuchen. Im Speziellen wurde die Frage geklärt, ob die Gabe von hCG in das Mausabortmodell den Mangel an T_{reg} -Zellen in diesen Mäusen ausgleichen und dadurch die Abortrate senken kann. Clark und Kollegen konnten bereits zeigen, dass die Abortverpaarung (CBA/J x DBA/2J) eine signifikant höhere Abortrate im Vergleich zu den normal schwangeren Mäusen (CBA/J x BALB/c) aufweist^[26]. Die Anzahl der Implantationen beider Verpaarungskombinationen war vergleichbar. Die erhöhte Abortrate in den Abortmäusen war mit einem Mangel an T_{reg} -Zellen sowohl systemisch als auch lokal assoziiert^[172]. Die protektive Wirkung des hCG wurde durch die Gabe von 10 IU/ml hCG in die Abortmäuse untersucht. Um Nebeneffekte des hCG auf die Schwangerschaft auszuschließen, wurden normal schwangere Mäuse ebenfalls mit 10 IU/ml hCG behandelt. Die hCG-Behandlung wies keinen negativen Einfluss auf die normale Schwangerschaft auf, da die Abortrate zwischen den hCG-behandelten und den PBS-behandelten normal schwangeren Mäusen vergleichbar war. Im Gegensatz dazu konnte eindrucksvoll demonstriert werden, dass die Gabe von hCG in die Abortmäuse die Abortrate signifikant senkt. Es konnte eine Abnahme der Abortrate von 15 % auf 0 % beobachtet werden. Um auszuschließen, dass der protektive Effekt des hCG auf die Schwangerschaft durch eine unterschiedliche Implantationsrate bewirkt wurde, wurde die Anzahl der Implantationen in den hCG- und PBS-behandelten Gruppen miteinander verglichen. Keine signifikanten Unterschiede ließen sich bezüglich der Implantationsrate zwischen den Gruppen feststellen. Es kann demnach angenommen werden, dass hCG nicht primär die Implantation beeinflusst, sondern im weiteren Verlauf der Schwangerschaft die fetale Abstoßung verhindert. Da der Transfer von T_{reg} -Zellen in Abortmäuse ebenfalls eine erfolgreiche Schwangerschaft gewährleistet, ist zu vermuten, dass die Gabe von hCG zu einer Erhöhung der T_{reg} -Zellanzahl führt, die eine Akzeptanz des Feten ermöglicht. In diesem Sinne konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit hCG im Vergleich zur Behandlung mit PBS zu einem signifikanten Anstieg an T_{reg} -Zellen im Thymus führte. HCG unterstützt demnach den Anstieg an natürlich vorkommenden T_{reg} -Zellen im Thymus und trägt zum schwangerschaftsfördernden systemischen Anstieg der T_{reg} -Zellen bei. Eine signifikante Erhöhung der T_{reg} -Zellanzahl nach Gabe von hCG konnte außerdem in den lokalen Lymphknoten im Vergleich zur PBS-Behandlung festgestellt werden. Entsprechend der Hypothese, in der T_{reg} -Zellen unmittelbar nach der Insemination in den lokalen Lymphknoten durch väterliche Antigene aktiviert werden und anschließend zur fetalmütterlichen Grenzfläche rekrutiert werden, unterstützt hCG die Expansion der T_{reg} -Zellen in den lokalen Lymphknoten. Im Blut bewirkte die Applikation von hCG sowohl in den normal schwangeren als auch in den Abortmäusen eine erhebliche Steigerung der T_{reg} -Zellanzahl. Die erhöhten T_{reg} -Zellanzahlen im Blut bekräftigen die Annahme, dass hCG eine attraktive Wirkung auf T_{reg} -Zellen hat. HCG scheint die Migration der T_{reg} -Zellen zur Dezidua zu begünstigen. Zur Bestätigung einer hCG-

vermittelten Migration von T_{reg} -Zellen aus den lokalen Lymphknoten über die Zirkulation in die fetal-mütterliche Grenzfläche sind *intra vitale* mikroskopische Aufnahmen notwendig, die in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt wurden, aber Bestandteil zukünftiger Untersuchungen sind. Neben einem systemischen Effekt des hCG auf die T_{reg} -Zellanzahl rief die Gabe von hCG auch einen signifikanten Anstieg der T_{reg} -Zellanzahl direkt in der Dezidua hervor. Dieser lokale Anstieg der T_{reg} -Zellen könnte den ausschlaggebenden Mechanismus zum Schutz des Feten darstellen. Sowohl in der Milz als auch in den dem Uterus nicht direkt benachbarten Lymphknoten führte die Gabe von hCG nur zu einem leichten Anstieg an T_{reg} -Zellen gegenüber der PBS-Behandlung. Obwohl T_{reg} -Zellen in allen diesen Organen generiert werden können, scheint hCG hier nur einen geringfügigen Einfluss auf die T_{reg} -Zellanzahl zu haben. Möglicherweise spielen diese Organe bei der Aufrechterhaltung des T_{reg} -Zellpools während der Schwangerschaft nur eine untergeordnete Rolle und eine Rekrutierung von T_{reg} -Zellen zur fetal-mütterlichen Grenzfläche findet vorwiegend aus den lokalen Lymphknoten statt.

5.8 HCG induziert einen tolerogenen Phänotyp in Dendritischen Zellen und begünstigt somit eine Expansion der T_{reg} -Zellen

Nachdem die Ergebnisse deutlich zeigen konnten, dass hCG einen positiven Einfluss auf die T_{reg} -Zellanzahl hat, stellte sich die Frage, ob die durch hCG hervorgerufene Expansion der T_{reg} -Zellen auf direktem Weg stattfindet oder über andere Immunzellen vermittelt wird. An Hand der Kokultivierungsexperimente von naiven T-Zellen mit hCG-produzierenden Trophoblastzellen konnte bereits gezeigt werden, dass hCG eine *de novo* Generierung von T_{reg} -Zellen begünstigt. Daher kann ein direkter Effekt des hCG auf die Generierung der T_{reg} -Zellen angenommen werden. Des Weiteren konnten andere Forschungsgruppen einen Einfluss von hCG auf DZ nachweisen. DZ spielen eine kritische Rolle bei der Regulierung von Immunantworten des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Die biologische Plastizität der DZ bei der Erzeugung von Immunität oder Toleranz scheint dabei von ihrem Reifezustand abzuhängen. Unreife DZ können effizient Antigene aufnehmen und präsentieren, exprimieren jedoch nur geringe Mengen an MHC II- und kostimulatorischen Molekülen, was zum Aufbau einer peripheren Toleranz beiträgt. Dagegen induzieren reife DZ eine Th1-Antwort in T-Zellen und erzeugen proinflammatorische Immunantworten^[339]. Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an $CD11c^+$ DZ in der Dezidua im Vergleich zum peripheren Blut während der Schwangerschaft stark ansteigt^[253]. Dabei handelt es sich bei der Mehrheit der DZ an der fetal-mütterlichen Grenzfläche in der Maus um myeloide DZ, die größtenteils einen unreifen (tolerogenen) Phänotyp aufweisen und große Mengen an IL-10 produzieren^[340]. Die Sekretion von IL-10 scheint ein Schlüsselmechanismus

für die Funktion der DZ an der fetal-mütterlichen Grenzfläche zu sein. Sie bewirkt sowohl eine direkte Inhibierung von Effektor T-Zellen^[341] als auch eine Generierung von T_{reg}-Zellen^[50]. Da hCG den Reifezustand von DZ zu beeinflussen scheint, ist eine durch hCG vermittelte indirekte Expansion des T_{reg}-Zellpools über DZ vorstellbar. Entsprechende Untersuchungen zur Modulation des DZ-Phänotyps durch hCG wurden bis zum jetzigen Zeitpunkt nur *in vitro* durchgeführt^{[249][269]} und geben keinen Aufschluss über die Wirkungsweise des hCG *in vivo*. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass hCG die Anzahl und den Phänotyp von CD11c⁺ DZ *in vivo* beeinflussen kann. Nach Gabe von hCG war die Anzahl an CD11c⁺-Zellen in der Dezidua gegenüber der Gabe von PBS signifikant vermindert. Die Charakterisierung der DZ zeigte, dass hCG den Reifezustand von dezidualen CD11c⁺-Zellen modulieren kann. Die für eine Präsentation von Antigenen gegenüber T-Zellen wichtigen Moleküle MHCII und CD80 (kostimulatorisches Molekül) waren nach hCG-Behandlung auf CD11c⁺-Zellen aus der Dezidua in ihrer Expression stark reduziert, sodass davon ausgegangen werden kann, dass hCG einen unreifen Phänotyp der DZ begünstigt. Dieser tolerogene Phänotyp bewirkt zum einen, dass die Aktivierung von naiven T-Zellen eingeschränkt ist, wodurch alloreaktive Effektorantworten gegenüber dem Fetus vermindert werden und zum anderen, dass sich die T_{reg}-Zellanzahl erhöht^[31]. Beide Vorgänge sind essentiell, um eine erfolgreiche allogene Schwangerschaft zu gewährleisten. Ein entsprechender Effekt des hCG auf CD11c⁺-Zellen aus der Milz konnte nicht nachgewiesen werden, sodass vermutet werden kann, dass hCG in erster Linie CD11c⁺-Zellen direkt an der fetal-mütterlichen Grenzfläche moduliert. Kokulturen zwischen CD11c⁺-Zellen und CD4⁺ T-Zellen aus der Dezidua von Abortmäusen konnten im Folgenden eindeutig zeigen, dass die hCG-behandelten CD11c⁺-Zellen im Vergleich zu den PBS-behandelten CD11c⁺-Zellen die Expression von Foxp3 signifikant stärker induzierten und somit die Generierung von T_{reg}-Zellen begünstigten. Diese Ergebnisse bestätigten eine mögliche durch hCG-vermittelte indirekte Induktion von T_{reg}-Zellen über DZ. Der Trophoblast trägt somit durch die Sekretion von hCG aktiv zu seinem eigenen Schutz bei, indem er alloreaktive Immunantworten des mütterlichen Immunsystems vermindert und die Generierung von T_{reg}-Zellen unterstützt.

5.9 HCG erhöht die suppressive Kapazität von T_{reg}-Zellen

Nachdem bereits ein Effekt des hCG auf die Generierung und Migration der T_{reg}-Zellen in der Schwangerschaft nachgewiesen werden konnte, wurde zudem untersucht, inwieweit hCG die suppressive Kapazität der T_{reg}-Zellen beeinflussen kann. Aus technischen Gründen war es leider nicht möglich die Wirkung des hCG auf deziduale T_{reg}-Zellen zu testen, da die Ausbeute an isolierten T_{reg}-Zellen aus

der Dezidua entsprechende Analysen verhinderte. In einer MLR zwischen hCG- oder PBS-behandelten T_{reg} -Zellen und $CD4^+CD25^-$ Effektor T-Zellen aus Abortmäusen konnte zunächst bestätigt werden, dass T_{reg} -Zellen eine suppressive Wirkung auf Effektor T-Zellen haben. Sowohl T_{reg} -Zellen aus einem Lymphknoten/Milz-Gemisch als auch T_{reg} -Zellen aus dem Thymus konnten die Proliferation der Effektor T-Zellen signifikant inhibieren. Interessanterweise war der suppressive Effekt der hCG-behandelten T_{reg} -Zellen aus Milz/Lymphknoten im Vergleich zu den PBS-behandelten T_{reg} -Zellen signifikant verstärkt. Khil und Kollegen konnten in einem Mausmodell für autoimmunbedingten Diabetes zeigen, dass die Gabe von hCG eine Induktion von T_{reg} -Zellen bewirkte, die den Ausbruch der Autoimmunerkrankung verhinderte^[260]. Die hCG-Behandlung erhöhte die Anzahl an T_{reg} -Zellen in der Milz und den pankreatischen Lymphknoten und führte darüber hinaus zu einer Verringerung der Anzahl an Effektor T-Zellen. Außerdem konnte die hCG-Gabe die IL-10- und TGF- β -Expression in den Milzzellen steigern, was auf eine erhöhte suppressive Funktion der T_{reg} -Zellen hinweist^[260]. Eine weitere Studie von Fuchs und Kollegen konnte zeigen, dass hCG die Generierung von Suppressor T-Zellen induzieren kann. Die generierten Suppressor T-Zellen konnten im Folgenden die Mitogen-induzierte Aktivierung von B-Zellen hemmen^{[246][270]}. Die Gabe von hCG scheint demnach die Fähigkeit der T_{reg} -Zellen Effektor T-Zellen und B-Zellen zu hemmen, zu unterstützen. Diese positive Wirkung des hCG auf die T_{reg} -Zellfunktion ermöglicht eine bessere Regulierung von Immunantworten an der fetal-mütterlichen Grenzfläche und erhöht die Akzeptanz gegenüber dem Fetus. Die Daten konnten keinen Effekt des hCG auf die Funktion von thymalen T_{reg} -Zellen belegen. Daher kann angenommen werden, dass hCG eine Expansion von thymalen T_{reg} -Zellen fördert, jedoch keinen unmittelbaren Einfluss auf deren Funktion hat.

An Hand der in dieser Arbeit gewonnenen Daten zur Wirkung des hCG auf die T_{reg} -Zellen in der Schwangerschaft lässt sich folgendes **hypothetisches Szenario** vorstellen (Abb.67):

Die unmittelbar nach der Insemination stattfindende Präsentation von väterlichen Antigenen im Vaginallumen, den lokalen Lymphknoten und im Thymus führt zu einer frühen Expansion des T_{reg} -Zellpools in der Schwangerschaft, die eine erfolgreiche Implantation des Embryos gewährleistet. Durch kontinuierliche Freisetzung von plazentalen Antigenen nach der Implantation wird der T_{reg} -Zellpool aufrechterhalten und ermöglicht die Toleranz gegenüber dem Fetus bis zur Geburt. Neben anti-inflammatorischen Zytokinen wie TGF- β und IL-10 scheint das Schwangerschaftshormon hCG die Expansion der antigenspezifischen T_{reg} -Zellen in den genannten Organen entscheidend zu begünstigen. Nach ihrer Aktivierung gelangen die T_{reg} -Zellen entlang eines hCG-Gradienten, der durch die

ständige Freisetzung von hCG vom Trophoblasten aufrechterhalten wird, zur fetal-mütterlichen Grenzfläche. Hier bewirkt hCG eine Steigerung der suppressiven Kapazität der T_{reg} -Zellen und unterstützt somit die Regulierung von alloreaktiven Immunantworten gegenüber dem Fetus. Darüber hinaus ist hCG direkt in die *de novo* Generierung von T_{reg} -Zellen aus naiven T-Zellen involviert. Auf indirektem Weg kann zudem eine durch hCG-vermittelte Expansion von T_{reg} -Zellen über DZ angenommen werden. HCG moduliert hierbei den Reifezustand der DZ und ermöglicht die Aufrechterhaltung eines tolerogenen Phänotyps, der zur Generierung von T_{reg} -Zellen beiträgt. Literaturdaten lassen vermuten, dass auch IL-10 in diesen Prozess involviert sein könnte^[50]. Diese durch hCG hervorgerufenen Mechanismen tragen dazu bei, dass die Anzahl und die Funktion der T_{reg} -Zellen direkt an der fetal-mütterlichen Grenzfläche beeinflusst werden und einer fetalen Abstoßung auf diesem Weg entgegengewirkt werden kann.

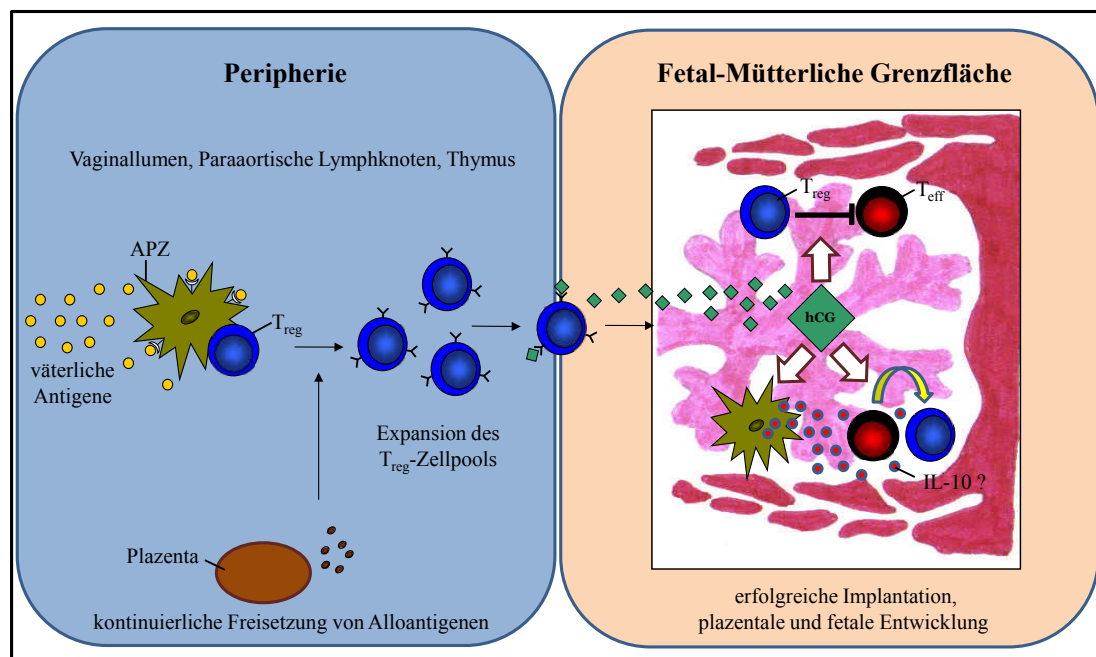


Abb. 67: Hypothetisches Szenario zur Wirkung des hCG auf die T_{reg} -Zellen im Verlauf der Schwangerschaft. Nach der frühen Expansion des T_{reg} -Zellpools durch väterliche Antigene im Vaginallumen, den paraaortischen Lymphknoten und im Thymus gelangen aktivierte T_{reg} -Zellen entlang eines hCG-Gradienten, der vom Trophoblasten produziert wird, zur fetal-mütterlichen Grenzfläche. Hier bewirkt hCG eine Steigerung der suppressiven Kapazität der T_{reg} -Zellen und ist darüber hinaus direkt in die *de novo* Generierung von T_{reg} -Zellen involviert sowie auf indirektem Weg über die Modulierung von DZ. Insgesamt tragen die durch hCG vermittelten Mechanismen zur Erhöhung der Anzahl und Funktion der T_{reg} -Zellen bei und unterstützen auf diesem Weg den erfolgreichen Verlauf der Schwangerschaft.

5.10 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend betrachtet konnte in dieser Arbeit die Bedeutung der T_{reg}-Zellen für die normal verlaufende Schwangerschaft bestätigt werden. Die Arbeit hat entscheidend dazu beigetragen, die Antigen-spezifität der T_{reg}-Zellen in der Schwangerschaft zu bestätigen und hat Faktoren aufgezeigt, die eine Expansion der T_{reg}-Zellen während der frühen Schwangerschaft bewirken. Als wegweisend für zukünftige Therapien hat sich herausgestellt, dass das Schwangerschaftshormon hCG einen entscheidenden Einfluss auf die Generierung, Expansion, Migration und Funktion der T_{reg}-Zellen während der Schwangerschaft hat. Die Arbeit konnte zeigen, dass es einen Zusammenhang zwischen beiden für die Schwangerschaft essentiellen Faktoren gibt und liefert erste Hinweise zur Erklärung erhöhter Schwangerschaftsraten nach Behandlung von IVF-Patientinnen mit hCG. Allerdings muss in Zukunft abgewogen werden, inwieweit die Behandlung von IVF-Patientinnen mit hCG und die damit einhergehende bessere Aussicht schwanger zu werden die Nachteile eines ovariellen Überstimulationssyndroms überwiegt. Weitere klinische Studien sind zudem notwendig, um den Effekt des hCG auf die T_{reg}-Zellen im Menschen zu bestätigen. Neben dem therapeutischen Einsatz von hCG wären in Zukunft auch adoptive Transferstudien von T_{reg}-Zellen vorstellbar, um den Mangel an T_{reg}-Zellen in Patientinnen mit Spontanaborten auszugleichen. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass eine Immunisierung der Frau mit väterlichen Immunzellen vor der Schwangerschaft die Schwangerschaftsrate verbessern konnte^[342]. Der Transfer war nachweislich mit einer Erhöhung von T_{reg}-Zellen assoziiert^[343]. Auf Grund des hohen therapeutischen Potenzials der T_{reg}-Zellen ist ein Einsatz dieser Zellen auch bei der Behandlung von immunologisch bedingten Schwangerschaftskomplikationen vorstellbar. Hierfür ist es jedoch erforderlich, spezifische Antigene zur Aktivierung der T_{reg}-Zellen zu identifizieren sowie Kultivierungs- und Transfermethoden der T_{reg}-Zellen in Zukunft zu optimieren, um die gewünschten Erfolge erzielen zu können.

6 Zusammenfassung

Während der Schwangerschaft muss das mütterliche Immunsystem einerseits körperfremde Antigene (Pathogene) abwehren, um Infektionen zu verhindern und andererseits die fremden Antigene, die vom Feten exprimiert werden, tolerieren. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Regulatorische T-Zellen (T_{reg} -Zellen) während der Schwangerschaft ansteigen und einen entscheidenden Beitrag zur fetalen Toleranz leisten. Allerdings sind die genauen Mechanismen ihres Anstiegs und ihrer Wirkungsweise noch weitgehend ungeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit haben Untersuchungen im Maussystem ergeben, dass T_{reg} -Zellen sich schon vor der Schwangerschaft zum Zeitpunkt des Estrus (empfängliche Phase) in verschiedenen Organen anreichern. Auf Grund dieser Beobachtungen kann vermutet werden, dass die Anreicherung der T_{reg} -Zellen der Vorbereitung einer bevorstehenden Schwangerschaft und dabei insbesondere der Unterstützung der Einnistung der Blastozyste in das mütterliche Endometrium dient. Frühere Studien unserer Arbeitsgruppe konnten bereits nachweisen, dass der fetale Schutz durch den Anstieg und die Funktion von antigenspezifischen T_{reg} -Zellen vermittelt wird. *In vivo* Untersuchungen zum Anstieg der T_{reg} -Zellen in der frühen Mausschwangerschaft konnten zeigen, dass sowohl Spermienantigene als auch väterliche Antigene der Samenblasenflüssigkeit für den Anstieg der antigenspezifischen T_{reg} -Zellen notwendig sind. Weiterführende *in vitro* Versuche haben darüber hinaus gezeigt, dass das in der Samenblasenflüssigkeit enthaltene TGF- β den Anstieg der T_{reg} -Zellen begünstigt. Erstmals konnte in dieser Arbeit an Humanproben gezeigt werden, dass das menschliche Schwangerschaftshormon Choriongonadotropin (hCG) die Migration von T_{reg} -Zellen zu Trophoblastzellen vermittelt und eine Konversion von naiven T-Zellen in T_{reg} -Zellen direkt an der fetal-mütterlichen Grenzfläche unterstützt. In Mäusen führte die Gabe von hCG in Abortweibchen, die weniger T_{reg} -Zellen haben und vermehrt Aborte aufweisen, zu einem systemischen und lokalen Anstieg der T_{reg} -Zellen. Es konnte nachgewiesen werden, dass hCG den Reifezustand von Dendritischen Zellen beeinflusst, wodurch diese in einem tolerogenen (unreifen) Zustand verbleiben und maßgeblich zur Expansion der T_{reg} -Zellen beitragen. Dieser durch hCG vermittelte Anstieg der T_{reg} -Zellen ermöglichte den Mangel an T_{reg} -Zellen in den Abortweibchen auszugleichen und verhinderte das Auftreten von Aborten. Letztendlich konnte auch gezeigt werden, dass die Gabe von hCG zu einer Erhöhung der suppressiven Kapazität der T_{reg} -Zellen an der fetal-mütterlichen Grenzfläche führt. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse tragen zum besseren Verständnis der Faktoren bei, die den Anstieg und die Funktion der T_{reg} -Zellen in der Schwangerschaft unterstützen und zukünftig die Grundlage zur Entwicklung von Therapien zur Behandlung von Schwangerschaftskomplikationen darstellen könnten.

7 Summary

During pregnancy the maternal immune system has to overcome two opposite challenges. On the one hand maternal immune cells have to combat pathogens which could cause infections. On the other hand maternal cells have to tolerate the foreign antigens expressed by the fetus. In the last years $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ regulatory T cells (T_{reg} cells) have been shown to increase during pregnancy and to be essential for the establishment of fetal tolerance. However, the mechanisms and factors supporting their increase and function are still under investigation. In the present work a variation in the number of T_{reg} cells could be observed already before pregnancy during the estrus cycle of the mouse. T_{reg} cells accumulated in the estrus phase (sexual receptive phase) of the cycle in several organs. Thus, it can be assumed that the accumulation of T_{reg} cells at the beginning of pregnancy favours the nidation of the blastocyst into the maternal endometrium and further implantation. Previous studies from our group already confirmed that fetal protection is mediated by antigen specific T_{reg} cells. However, the origin of the paternal antigens which promote the expansion of the T_{reg} cells are still unknown. *In vivo* experiments investigating the increase of T_{reg} cells during early pregnancy showed that both sperm antigens as well as paternal antigens from seminal fluid are necessary for the expansion of antigen specific T_{reg} cells. Furthermore *in vitro* experiments revealed that the immunosuppressive cytokine TGF- β , which represents a major component in the seminal fluid, provokes the proliferation of T_{reg} cells. By using human samples we could show that the human pregnancy hormone Chorionic Gonadotropin (hCG) mediates the migration of T_{reg} cells to trophoblast cells. Moreover, hCG supports the conversion of naive T cells into T_{reg} cells directly at the fetal-maternal interface. In mice, the application of hCG in abortion-prone females which suffer from spontaneous abortion and present diminished T_{reg} cell numbers results in a systemic and local increase of T_{reg} cells. The application of hCG had an influence on the maturation state of dendritic cells retaining them in a tolerogenic (immature) phenotype. Tolerogenic dendritic cells have been reported to promote the generation and expansion of T_{reg} cells. The observed expansion of T_{reg} cells in abortion-prone females after application of hCG may compensate the lack of T_{reg} cells in these animals and may be the mechanism undergoing the prevention of abortion. Finally, the application of hCG resulted in an augmentation of the suppressive capacity of T_{reg} cells at the fetal-maternal interface. All together, the data obtained in the present work fundamentally contribute to the knowledge of the factors which support the expansion and function of T_{reg} cells in pregnancy. These factors may represent the basis for the development of therapies to treat pregnancy complications in the future.

8 Literatur

- 1) Breckwoldt M, Kaufmann M, Pfeleiderer A (2007) Gynäkologie und Geburtshilfe; 5. Aufl., Thieme Verlag.
- 2) Schneider H, Husslein P, Schneider KTM (2006) Die Geburtshilfe; 3. Aufl., Springer Verlag.
- 3) Huppertz B, Kadyrov M, Kingdom JCP (2006) Apoptosis and its role in the trophoblast. *Am J Obstet Gynecol*; 195: 29-29.
- 4) Morrish DW, Dakour J, Li H (1998) Functional regulation of human trophoblast differentiation. *J Reprod Immunol*; 39: 179-195.
- 5) Pötgens AJ, Schmitz K, Bose P (2002) Mechanisms of syncytial fusion. *Placenta*; 23: 107-113.
- 6) Lala PK, Chakroborty C (2003) Factors regulating trophoblast migration and invasiveness: possible derangements contributing to preeclampsia and fetal injury. *Placenta*; 24: 575-587.
- 7) Becker V (1981) Die Plazenta des Menschen; Thieme Verlag.
- 8) Dickie MM, Atkinson WB, Fekete E (1957) The ovary, estrous cycle and fecundity of DBA x CE and reciprocal hybrid mice in relation to age and the hyperovarian syndrome. *Anat Rec*; 127: 187-199.
- 9) Short DJ, Woodnott DP Crosby Lockwood and Son Ltd. (1969) The IAT Manual of Laboratory Animal practice and techniques; 2. Aufl., Crosby Lockwood
- 10) Staley K, Scharfman H (2005) A woman's prerogative. *Nat Neurosci*; 8: 697-699.
- 11) Alberts B, Bray D, Lewis J (2002) Molecular Biology of the Cell; 4. Aufl., Taylor und Francis.
- 12) Wolpert L, Beddington R, Brockes J, Jessell T, Laurence P, Meyerowitz E (1999) Lehrbuch der Entwicklungsbiologie, Spektrum Verlag.
- 13) Wang H, Dey SK (2006) Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet*; 7: 185-199.

- 14) Rossant J, Cross JC (2001) Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat Rev Genet*; 2: 538-548.
- 15) Suzuki K, Kobayashi M, Kobayashi K, Shirashi Y, Goto S, Hoshino T (1997) Structural and functional change of blood vessel labyrinth in maturing placenta of mice. *Placenta*; 18: 155-164.
- 16) Drews U (1993) Taschenatlas der Embryologie; Thieme Verlag.
- 17) Edmonds DK, Lindsay KS, Miller JF, Williamson E, Wood PJ (1982) Early embryonic mortality in woman. *Fertil Steril*; 38: 447-453.
- 18) Miller JF, Williamson E, Glue J, Gordon YB, Grudzinskas JG, Sykes A (1980) Fetal loss after implantation, a prospective study. *Lancet*; 2: 554-556.
- 19) Pschyrembel (2002) Klinisches Wörterbuch; 259. Aufl., de Gruyter.
- 20) Taylor C, Faulk WP (1981) Prevention of recurrent abortion with leucocyte transfusion. *Lancet*; 2: 68-70.
- 21) Beer AE, Semprini AE, Zhu XY, Quebbeman JF (1985) Pregnancy outcome in human couples with recurrent spontaneous abortion: HLA-antigen profiles; HLA antigen sharing; female serum MLR blocking factors; and paternal leucocyte immunization. *Exp Clin Immunogenet*; 2: 137-153.
- 22) McIntyre JA (1987) New explanations for recurrent spontaneous abortion. *Contemporary OB/GYN*; 12: 29-44.
- 23) Heine O, Neppert J, Mueller-Eckhardt G (1989) Influence of immunization with allogeneic spleen cells on the number of viable neonates in mice. *J Reprod Immunol*; 15: 169-173.
- 24) Strowitzki T, Wiedemann R, Mempel W, Hepp H (1989) Immunologische Abklärung bei habituellen Aborten. *Archiv Gynecol Obstet*; 245: 1-4.
- 25) Christiansen OB, Riisom K, Lauritsen JG, Grunnert N, Jersild C (1989) Association of maternal HLA haplotypes with recurrent spontaneous abortion. *Tissue Antigens*; 34: 190-199.

- 26) Clark DA, McDermott MR, Szewczuk MR (1980) Impairment of host-versus-graft reaction in pregnant mice: II) Selective suppression of cytotoxic cell generation correlates with soluble suppressor activity and with successful allogeneic pregnancy. *Cell Immunol*; 52: 106-118.
- 27) Chaouat G, Menu E, Clark DA, Dy M, Minkowski M, Wegmann TG (1990) Control of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy. *J Reprod Fertil*; 89: 447-458.
- 28) Chaouat G, Assal-Meliani A, Martal J, Raghupathy R, Elliot J, Mosmann T, Wegmann TG (1995) IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2J mating combination, and local defect in IL-10-production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN. *J Immunol*; 154: 4261-4268.
- 29) Zenclussen AC, Blois S, Stumpo R, Olmos S, Arias K, Malan Borel I, Roux ME, Margni RA (2003) Murine abortion is associated with enhanced interleukin-6 levels at the feto-maternal interface. *Cytokine*; 24: 150-160.
- 30) Zenclussen AC, Sollwedel A, Bertoja AZ, Gerlof K, Zenclussen ML, Woiciechowsky C, Volk HD (2005) Heme oxygenase as a therapeutic target in immunological pregnancy complications. *Int Immunopharmacol*; 5: 41-51.
- 31) Chaouat G, Clark DA, Wegmann TG (1988) Genetic aspects of the CBA x DBA/2 and B10 x B10. A model of murine pregnancy failure and its prevention by lymphocyte immunisation. Early pregnancy loss: mechanisms and treatment; Springer Verlag.
- 32) Medawar PB (1953) Some immunological and endocrinological problems raised by evolution of viviparity in vertebrates. *Symposia of the Society for Experimental Biology*; Syndics of the Cambridge University Press.
- 33) Braunstein GD, Vaitukaitis JL, Carbone PP, Ross GT (1973) Ectopic production of human chorionic gonadotropin by neoplasms. *Ann Intern Med*; 78: 39-45.
- 34) Khosrotehrani K, Johnson KL, Guégan S, Stroh H, Bianchi DW (2005) Natural history of fetal microchimerism during and following murine pregnancy. *J Reprod Immunol*; 66: 1-12.

- 35) Tan XW, Liao H, Sun L, Okabe M, Xiao ZC (2005) Fetal microchimerism in the maternal mouse brain: a novel population of fetal progenitor or stem cells able to cross the blood-brain barrier? *Stem cells*; 23: 1443-1452.
- 36) Elbe-Bürger A, Mommaas AM, Prieschl EE, Fiebiger E, Baumruker T, Stingl G (2000) Major histocompatibility complex class II fetal skin dendritic cell are potent accessory cells of polyclonal T-cell responses. *Immunology*; 101: 242-253.
- 37) Tafuri A, Alferink J, Möller P, Hämmerling GJ, Arnold B (1995) T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy. *Science*; 270: 630-633.
- 38) Jiang SP, Vacchio MS (1998) Multiple mechanisms of peripheral T cell tolerance to the fetal "allograft". *J Immunol*; 160: 3086-3090.
- 39) Moldenhauer LM, Diener KR, Thring DM, Brown MP, Hayball JD, Robertson SA (2009) Cross-presentation of male seminal fluid antigens elicits T cell activation to initiate the female immune response to pregnancy. *J Immunol*; 182: 8080-8093.
- 40) Barker CF, Billingham RE (1977) Immunologically privileged sites. *Adv Immunol*; 25: 1-54.
- 41) Hunt JS, Andrews GK, Wood GW (1987) Normal trophoblast resist induction of class I HLA. *J Immunol*; 138: 337-344.
- 42) Rouss-Freiss N, Goncalves RM, Menier C, Dausset J, Carosella ED (1997) Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*; 94: 11520-11525.
- 43) Makriagiannis A, Zoumakis E, Kalantaridou C, Coutifaris C, Margioris AN, Coukos G, Rice KC, Gravansi A, Chrousos GP (2001) Corticotropin-releasing hormone promotes blastocytes implantation and early maternal tolerance. *Nat Immunol*; 18: 367-391.
- 44) Rogers AM, Boime I, Connolly J, Cook JR, Russell JH (1998) Maternal-fetal tolerance is maintained despite transgene-driven trophoblast expression of MHC class I, and defects in Fas and its ligand. *Eur J Immunol*; 28: 3479-3487.

- 45) Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL (1998) Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science*; 281: 1191-1193.
- 46) Mellor AL, Munn DH (2001) Tryptophan catabolism prevents maternal T cells from activating lethal anti-fetal immune responses. *J Reprod Immunol*; 52: 5-13.
- 47) Baban B, Chandler P, McCool D, Marshall B, Munn DH, Mellor AL (2004) Indoleamine 2,3 dioxygenase expression is restricted to fetal trophoblast giant cells during murine gestation and is maternal genome specific. *J Reprod Immunol*; 61: 67-77.
- 48) Fest S, Aldo PB, Abrahams VM, Visintin I, Alvero A, Chen R, Chavez SL, Romero R, Mor G (2007) Trophoblast-macrophage interactions: a regulatory network for the protection of pregnancy. *Am J Reprod Immunol*; 57: 55-66.
- 49) Zenclussen ML, Thuere C, Ahmad N, Wafula P, Fest S, Teles A, Leber A, Casalis PA, Bechmann I, Priller J, Volk HD, Zenclussen AC (2010) The persistence of paternal antigens in the maternal body is involved in regulatory T cell expansion and fetal-maternal tolerance in murine pregnancy. *Am J Reprod Immunol*; 63: 200-208.
- 50) Wakkach A, Fournier N, Brun V, Breittmayer JP, Cottrez F, Groux H (2003) Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory cell differentiation in vivo. *Immunity*; 18: 605-617.
- 51) Ilarregui JM, Croci DO, Bianco GA, Toscano MA, Salatino M, Vermeulen ME, Geffner JR, Rabinovich GA (2009) Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nat Immunol*; 10: 981-991.
- 52) Rémy S, Blancou P, Tesson L, Tardif V, Brion R, Royer PJ, Motterlini R, Foresti R, Painchaut M, Pogu S, Gregoire M, Bach JM, Anegon I, Chauveau C (2009) Carbon monoxide inhibits TLR-induced dendritic cell immunogenicity. *J Immunol*; 182: 1877-1884.

- 53) Moreau A, Hill M, Thébault P, Dechamps JY, Chiffolleau E, Chauveau C, Moullier P, Anegon I, Alliot-Licht B, Cuturi MC (2009) Tolerogenic dendritic cells actively inhibit T cells through heme oxygenase-1 in rodents and in nonhuman primates. *FASEB J*; 23: 3070-3077.
- 54) Chauveau C, Rémy S, Royer PJ, Hill M, Tanguy-Royer S, Hubert FX, Tesson L, Brion R, Berioux G, Gregoire M, Josien R, Cuturi MC, Anegon I (2005) Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood*; 106: 1694-1702.
- 55) Kotsch K, Martins PN, Klemz R, Janssen U, Gerstmayer B, Dernier A, Reutzel-Selke A, Kuckelkorn U, Tullius SG, Volk HD (2007) Heme oxygenase-1 ameliorates ischemia/reperfusion injury by targeting dendritic cell maturation and migration. *Antioxid Redox Signal*; 9: 2049-2063.
- 56) Murphy SP, Fast LD, Hanna NN, Sharma S (2005) Uterine NK cells mediate inflammation induced fetal demise in IL-10-null mice. *J Immunol*; 175: 4084-4090.
- 57) Croy BA, van den Heuvel MJ, Borzychowski AM, Tayade C (2006) Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones. *Immunol Rev*; 214: 161-185.
- 58) Greenwood JD, Minhas K, Di Santo JP, Makita M, Kiso Y, Croy BA (2000) Ultrastructural studies of implantation sites from mice deficient in uterine natural killer cells. *Placenta*; 21: 693-702.
- 59) Padilla L, Reinicke K, Montesino H, Villena F, Asencio H, Cruz M, Rudolph MI (1990) Histamine content and mast cells distribution in mouse uterus: the effect of sexual hormones, gestation and labor. *Cell Mol Biol*; 36: 93-100.
- 60) Tabb NT (1994) Immune control of myometrial contractility: Role of mast cells. *Control of uterine contractility*; Eds. CRC Press, Boca de Raton.
- 61) Varayoud J, Ramos JG, Bosquiaz VL, Munoz-de-Toro M, Luque EH (2004) Mast cells degranulation affects angiogenesis in the rat uterine cervix during pregnancy. *Reproduction*; 127: 379-387.

- 62) Lu LF, Lind EF, Gondek DC, Bennett KA, Gleeson MW, Pino-Lagos K, Scott ZA, Coyle AJ, Reed JL, Snick JV, Strom TB, Zheng XX, Noelle RJ (2006) Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature*; 31: 997-1002.
- 63) Malan Borel I, Gentile T, Angelucci J, Pividori J, Guala MC, Binaghi RA, Margni RA (1991) IgG asymmetric molecules with antipaternal activity isolated from sera and placenta of pregnant human. *J Reprod Immunol*; 20: 129-140.
- 64) Jalali GR, Rezai A, Underwood JL, Mowbray JF, Surridge SH, Allen WR, Matthias S (1995) An 80-kDa syncytiotrophoblast alloantigen bound to maternal alloantibody in term placenta. *Am J Reprod Immunol*; 33: 213-220.
- 65) Zenclussen AC, Gentile T, Kortebani G, Mazzolli A, Margni R (2001) Asymmetric antibodies and pregnancy. *Am J Reprod Immunol*; 45: 289-294.
- 66) Gentile T, Malan Borel I, Angelucci J, Miranda S, Margni R (1992) Preferential synthesis of asymmetric antibodies in rat immunized with paternal particulate antigens. Effects on pregnancy. *J Reprod Immunol*; 22: 173-183.
- 67) Gentile T, Llambias P, Dokmetjian J, Margni RA (1998) Effect of pregnancy and placental factors on the quality of humoral immune response. *Immunol Lett*; 62: 151-157.
- 68) Margni RA, Malan Borel I (1999) Role of asymmetric antibodies in fetal maintenance. *Curr Trends Immunol*; 2: 153-163.
- 69) Canellada A, Färber A, Zenclussen AC, Gentile T, Dokmetjian J, Keil A, Blois S, Miranda S, Berod L, Gutierrez G, Markert UR, Margni RA (2002) Interleukin regulation of asymmetric antibody synthesized by isolated placental B cells. *Am J Reprod Immunol*; 48: 275-282.
- 70) Piccinni MP, Beloni L, Livi C, Maggi E, Scarselli G, Romagnani S (1998) Defective production of both, leukemia inhibitor factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nat Med*; 4: 1020-1024.
- 71) Dealtry GB, O'Farrell MK, Fernandez N (2000) The Th2 cytokine environment of the placenta. *Int Arch Allergy Immunol*; 123: 107-119.

- 72) White CA, Johansson M, Roberts CT, Ramsay AJ, Robertson SA (2003) Effect of interleukin-10 null mutation on maternal immune response and reproductive outcome in mice. *Biol Reprod*; 70: 123-131.
- 73) Gorivodsky M, Torchinsky A, Zemliak I, Savion S, Fein A, Toder V (1999) TGF beta2 mRNA expression and pregnancy failure in mice. *Am J Reprod Immunol*; 42: 124-133.
- 74) Dünker N, Krieglstein K (2002) Tgfbeta2^{-/-} Tgfbeta3^{-/-} double knockout mice display severe midline fusion defects and early embryonic lethality. *Anat Embryol*; 206: 73-83.
- 75) Lin H, Mossmann TR, Guilbert L, Tuntipopipat S, Wegmann TG (1993) Synthesis of T helper 2-type cytokines at the feto-maternal interface. *J Immunol*; 151: 4562-4573.
- 76) Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Hassan N, Al-Azemi M, Al-Shamali E (1999) Maternal Th1- and Th2-type reactivity to placental antigens in normal human pregnancy and unexplained recurrent spontaneous abortions. *Cell Immunol*; 196: 122-130.
- 77) Saito S (2001) Cytokine network at the feto-maternal interface. *J Reprod Immunol*; 47: 87-103.
- 78) Svensson L, Arvola M, Sallstrom MA, Holmdahl R, Mattsson R (2001) The Th2 cytokines IL-4 and IL-10 are not crucial for the completion of allogeneic pregnancy in mice. *J Reprod Immunol*; 51: 3-7.
- 79) Fallon PG, Jolin HE, Smith P, Emson CL, Townsend MJ, Fallon R, Smith P, McKenzie AN (2002) IL-4 induces characteristic Th2 even in the combined absence of IL-5, IL-9 and IL-13. *Immunity*; 17: 7-17.
- 80) Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT (2005) Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop in a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*; 6: 1123-1132.
- 81) Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C (2005) A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*; 6: 113-114.

- 82) Albanesi C, Cavani A, Girolomoni G (1999) IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonistic effects with IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol*; 162: 494-502.
- 83) Nakashima A, Ito M, Shima T, Bac ND, Hidaka T, Saito S (2010) Accumulation of IL-17-positive cells in decidua of inevitable abortion cases. *Am J Reprod Immunol*; 64: 4-11.
- 84) Wang WJ, Hao CF, Yi-Lin, Yin GJ, Bao SH, Qiu LH, Lin QD (2010) Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *J Reprod Immunol*; 84: 164-170.
- 85) Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S (1993) Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol*; 150: 353-360.
- 86) Bhatt H, Brunet LJ, Stewart CL (1991) Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proc Natl Acad Sci USA*; 88: 11408-11412.
- 87) Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, Abbondanzo SJ (1992) Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*; 359: 76-79.
- 88) Mikolajczyk M, Skrzypczak J, Szymanowski K, Wirstlein P (2003) The assessment of LIF in uterine flushing: a possible new diagnostic tool in states of impaired fertility. *Reprod Biol*; 3: 259-270.
- 89) Robertson SA (2005) Seminal plasma and male factor signaling in the female reproductive tract. *Cell Tissue Res*; 322: 43-52.
- 90) Zhao H, Wong RJ, Kalish FS, Nayak NR, Stevenson DK (2009) Effect of Heme Oxygenase-1 deficiency on placental development. *Placenta*; 10: 861-868.
- 91) Poss K, Tonegawa S (1997) Reduced stress defense in Heme Oxygenase-1 deficient cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 94: 10925-10930.

- 92) Yet SF, Perrella MA, Layne MD, Hsieh CM, Maemura K, Kobzik L, Wiesel P, Christou H, Kourembanas S, Lee ME (1999) Hypoxia induces severe right ventricular dilatation and infarction in Heme Oxygenase-1 null mice. *J Clin Invest*; 103: 23-29.
- 93) Zenclussen ML, Anegón I, Bertoja AZ, Chauveau C, Vogt K, Gerlof K, Sollwedel A, Volk HD, Ritter T, Zenclussen AC (2006) Over-expression of Heme Oxygenase-1 by adenoviral gene transfer improves pregnancy outcome in a murine model of abortion. *J Reprod Immunol*; 69: 35-52.
- 94) Sollwedel A, Bertoja AZ, Zenclussen ML, Gerlof K, Lisewski U, Wafula P, Sawitzki B, Woiciechowsky C, Volk HD, Zenclussen AC (2005) Protection from abortion by Heme Oxygenase-1 up-regulation is associated with increased levels of Bag-1 and Neuropilin-1 at the fetal-maternal interface. *J Immunol*; 175: 4875-4885.
- 95) Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M (1995) Immunological self-tolerance maintained by activated T-cells expressing IL-2 receptor alphachains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various auto-immune diseases. *J Immunol*; 155: 1151-1164.
- 96) Kingsley CL, Karim M, Bushell AR, Wood K (2002) CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol*; 168: 1080-1086.
- 97) Coombes JL, Robinson NJ, Maloy KJ, Uhlig HH, Powrie F (2005) Regulatory T cells and intestinal homeostasis. *Immunol Rev*; 204: 184-194.
- 98) Wahl SM, Vazquez N, Chen W (2004b) Regulatory T cells and transcription factors: gatekeepers in allergic inflammation. *Curr Opin Immunol*; 16: 768-774.
- 99) Munn DH, Mellor AL (2006) The tumor-draining lymph node as an immune-privileged site. *Immunol Rev*; 213: 146-158.
- 100) Gershon RK, Cohen P, Hencin R, Liebhaver SA (1972) Suppressor T cells. *J Immunol*; 108: 586-590.

- 101) Bruder D, Probst-Kepper M, Westendorf AM, Geffers R, Beissert S, Loser K, von Boehmer H, Buer J, Hansen W (2004) Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol*; 34: 623-630.
- 102) Jonuleit H, Schmitt E (2003) The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol*; 171: 6323-6327.
- 103) Mills KH (2004) Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol*; 4: 841-855.
- 104) Smith TR, Kumar V (2008) Revival of CD8+ Treg-mediated suppression. *Trends Immunol*; 29: 337-342.
- 105) Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko A, de Vries JE, Roncarolo MG (1997) A CD4+ T cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis . *Nature*; 389: 737-742.
- 106) Weiner HL (2001) Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev*; 182: 207-214.
- 107) Robertson SA (2000) Control of the immunological environment of the uterus. *Rev Reprod*; 5: 164-174.
- 108) Sakaguchi S (2000) Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*; 101: 455-458.
- 109) Shevach EM (2002) CD4+CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol*; 2: 389-400.
- 110) Wang J, Joan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE (2007) Transient expression of Foxp3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol*; 37: 129-138.
- 111) Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paeper B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F (2001) Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*; 27: 68-73.

- 112) Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*; 4: 330-336.
- 113) Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, Sakaguchi S (1999) Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol*; 62: 5317-5326.
- 114) Fontenot JD, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY (2005a) Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J Exp Med*; 202: 901-906.
- 115) Guerin LR, Prins JR, Robertson SA (2009) Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? *Hum Reprod Update*; 15: 517-535.
- 116) von Boehmer H, Teh HS, Kisielow P (1989) The thymus selects the useful, neglects the useless and destroys the harmful. *Immunol Today*; 10: 57-61.
- 117) Seddon B, Mason D (1999) Peripheral autoantigen induces regulatory T cells that prevent autoimmunity. *J Exp Med*; 189: 877-882.
- 118) Cozzo C, Lerman MA, Boesteanu A, Larkin J 3rd, Jordan MS, Caton AJ (2005) Selection of CD4+CD25+ regulatory T cells by self-peptides. *Curr Microbiol Immunol*; 293: 3-23.
- 119) Abbas AK, Lohr J, Knoechel B (2007) Balancing autoaggressive and protective T cell responses. *J Autoimmun*; 28: 59-61.
- 120) Gavin MA, Clarke SR, Negrou E, Gallegos A, Rudensky A (2002) Homeostasis and anergy of CD4+CD25+ suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol*; 3: 33-41.
- 121) Fisson S, Darrasse-Jeze G, Litvinova E, Septier F, Klatzmann D, Liblau R, Salomon BL (2003) Continuous activation of autoreactive CD4+CD25+ regulatory T cells in the steady state. *J Exp Med*; 198: 737-746.
- 122) Walker LSK, Chodos A, Eggena M, Dooms H, Abbas AK (2003) Antigen-dependent proliferation of CD4+CD25+ regulatory T cells in vivo. *J Exp Med*; 198: 249-258.

- 123) Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC (2003) Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*; 21: 685-711.
- 124) Sato K, Yamashita N, Baba M, Matsuyama T (2003) Modified myeloid dendritic cells act as regulatory dendritic cells to induce anergic and regulatory T cells. *Blood*; 101: 3581-3589.
- 125) Chen W, Liang X, Peterson AJ, Munn DH, Blazar BR (2008) The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *J Immunol*; 181: 5396-5404.
- 126) Sharma MD, Baban B, Chandler P, Hou DY, Singh N, Yagita H, Azuma M, Blazar BR, Mellor AL, Munn DH (2007) Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest*; 117: 2570-2582.
- 127) Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A, Candeloro P, Belladonna ML, Bianchi R, Fioretti MC (2002) CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol*; 3: 1097-1101.
- 128) Munn DH, Sharma MD, Lee JR, Jhaver KG, Johnson TS, Keskin DB, Marshall B, Chandler P, Antonia SJ, Burgess R, (2002) Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science*; 297: 1867-1870.
- 129) Scheffold A, Huhn J, Hofer T (2005) Regulation of CD4+CD25+ regulatory T cell activity: it takes (IL-)two to tango. *Eur J Immunol*; 35: 1336-1341.
- 130) Koenen HJ, Fasse E, Joosten I (2003) IL-15 and cognate antigen successfully expand de novo-induced human antigen-specific regulatory CD4+ T cells that require antigen-specific activation for suppression. *J Immunol*; 171: 6431-6441.
- 131) Thornton AM, Piccirillo CA, Shevach EM (2004) Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *Eur J Immunol*; 34: 366-376.

- 132) Harnaha J, Machen J, Wright M, Lakomy R, Styche A, Trucco M, Makaroun S, Giannoukakis N (2006) Interleukin-7 is a survival factor for CD4+CD25+ T-cells and is expressed by diabetes-suppressive dendritic cells. *Diabetes*; 55: 158-170.
- 133) Gorelik L, Flavell RA (2002) Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol*; 2: 46-53.
- 134) Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM (2003) Conversion of peripheral CD4+CD25+ naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*; 198: 1875-1886.
- 136) Schumacher A, Brachwitz N, Sohr S, Engeland K, Langwisch S, Dolaptchieva M, Alexander T, Taran A, Malfertheiner SF, Costa SD, Zimmermann G, Nitschke C, Volk HD, Alexander H, Gunzer M, Zenclussen AC (2009) Human chorionic gonadotropin attracts regulatory T cells into fetal-maternal interface during early human pregnancy. *J Immunol*; 182: 5488-5497.
- 136) Schumacher A, Wafula PO, Bertoja AZ, Sollwedel A, Thuere C, Wollenberg I, Yagita H, Volk HD, Zenclussen AC (2007) Mechanisms of action of regulatory T cells specific for paternal antigens during pregnancy. *Obstet Gynecol*; 110: 1137-1145.
- 137) Piccirillo CA, Shevach EM (2001) Cutting edge: Control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol*; 167: 1137-1140.
- 138) Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, Kim CH (2005) Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*; 175: 4180-4183.
- 139) Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, Puig PE, Novault S, Escudier B, Vivier E (2005a) CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med*; 202: 1075-1085.
- 140) Cederbom L, Hall H, Ivars F (2000) CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol*; 30: 1538-1543.

- 141) Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV (2004) Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol*; 172: 4676-4680.
- 142) Taams LS, van Amelsfort JMR, Tiemessen MM, Jacobs KMG, de Jong EC, Akbar AN, Bijlsma JWJ, Lafeber FFJG (2005) Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Human Immunol*; 66: 222-230.
- 143) Adcock EW 3rd, Teasdale T, August CS, Cox S, Meschia G, Ballaglia TC, Naughton MA (1973) Human chorionic gonadotropin: its possible role in maternal lymphocyte suppression. *Science*; 181: 845-847.
- 143) Scheffold A, Murphy KM, Höfer T (2007) Competition for cytokines: T(reg) cells take all. *Nat Immunol*; 8: 1285-1287.
- 144) Taylor PA (2004) B7 expression on T cells down-regulates immune responses through CTLA-4 ligation via T-T interactions. *J Immunol*; 172: 34-39.
- 145) Grohmann U, Fallarino F, Puccetti P (2003) Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol*; 24: 242-248.
- 147) Mellor AL, Munn DH (2004) IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol*; 4: 762-774.
- 148) Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre MC, Puccetti P (2003) Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol*; 4: 1206-1212.
- 148) Lee GK, Park HJ, Macleod M, Chandler P, Munn DH, Mellor AL (2002) Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior cell division. *Immunology*; 107: 1-9.
- 149) Taams L, Boot E, van Eden W, Wauben M (2000) Anergic T cells modulate the T-cell-activating capacity of antigen presenting cells. *J Autoimmun*; 14: 335-341.

- 150) Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH (1995) Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*; 3: 541-547.
- 151) Gorelik L, Flavell RA (2000) Abrogation of TGFbeta signalling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity*; 12: 171-181.
- 152) Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW, Sakaguchi S (2000) Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med*; 192: 303-310.
- 153) Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, Hipkiss EL, Ravi S, Kowalski J, Levitsky HI (2004) Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity*; 21: 503-513.
- 154) Miyara M, Sakaguchi S (2007) Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med*; 13: 108-116.
- 155) von Boehmer (2005) Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol*; 6: 338-344.
- 156) de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A (2004) Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol*; 34: 2480-2488.
- 157) Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H, Stassen M, Knop J, Enk AH (2002) Infectious tolerance: human CD25+ regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4+ T helper cells. *J Exp Med*; 196: 255-260.
- 158) Sucia-Foca N, Manavalan JS, Cortesini R (2003) Generation and function of antigen-specific suppressor and regulatory T cells. *Transpl Immunol*; 23: 445-449.
- 159) Hubert P, Jacobs N, Caberg J-H, Boniver J, Delvenne P (2007) The crosstalk between dendritic and regulatory T cells: good or evil? *Leukoc Biol*; 82: 781-794.

- 160) Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, Sansom DM, Drayson MT (2004) Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology*; 112: 38-43.
- 161) Mjösberg J, Svensson J, Johansson E, Hellström L, Casas R, Jenmalm MC, Boij R, Matthiesen L, Jönsson JI, Berg G, Ernerudh J (2009) Systemic reduction of functionally suppressive CD4dimCD25highFoxp3+ Tregs in human second trimester pregnancy is induced by progesterone and 17 beta-estradiol. *J Immunol*; 183: 759-769.
- 162) Jasper MJ, Tremellen KP, Robertson SA (2006) Primary unexplained infertility is associated with reduced expression of the T-regulatory cell transcription factor Foxp3 in endometrial tissue. *Mol Hum Reprod*; 12: 301-308.
- 163) Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, Higuma S, Shiozaki A, Saito A, Saito S (2004) Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol Hum Reprod*; 10: 347-353.
- 164) Arruvito L, Billordo A, Capucchio M, Prada ME, Fainboim L (2009) IL-6 trans-signaling and the frequency of CD4+Foxp3+ cells in women with reproductive failure. *J Reprod Immunol*; 82: 158-165.
- 165) Mjösberg J, Berg G, Jenmalm MC, Ernerudh J (2010) Foxp3+ regulatory T cells and T helper 1, T helper 2, and T helper 17 cells in human early pregnancy decidua. *Biol Reprod*; 82: 698-705.
- 166) Sasaki Y, Darmochwal-Kolarz D, Suzuki D, Sakai M, Ito M, Shima T, Shiozaki A, Rolinski J, Saito S (2007) Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+)CD25(bright) regulatory T cells in pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol*; 149: 139-145.
- 167) Paeschke S, Chen F, Horn N, Fotopoulou C, Zambon-Bertoja A, Sollwedel A, Zenclussen ML, Casalis PA, Dudenhausen JW, Volk HD, Zenclussen AC (2005) Preeclampsia is not associated with changes in the levels of regulatory T cells in peripheral blood. *Am J Reprod Immunol*; 54: 384-389.

- 168) Santner-Nanan B, Peek MJ, Khanam R, Richarts L, Zhu E, Fazekas de St Groth B, Nanan R (2009) Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17-producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. *J Immunol*; 183: 7023-7030.
- 169) Prins JR, Boelens HM, Heimweg J, van der Heide S, Dubois AE, van Oosterhout AJ, Erwich JJ (2009) Preeclampsia is associated with lower percentages of regulatory T cells in maternal blood. *Hypertens Pregnancy*; 28: 300-311.
- 170) Toldi G, Svec P, Vasarhelyi B, Meszaros G, Rigo J, Tulassay T, Treszl A (2008) Decreased number of Foxp3+ regulatory T cells in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand*; 87: 1229-1233.
- 171) Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG (2004) Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol*; 5: 266-271.
- 172) Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, Sollwedel A, Zambon Bertoja A, Ritter A, Kotsch K, Leber J, Volk HD (2005) Abnormal T cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4+CD25+ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. *Am J Pathol*; 166: 811-822.
- 173) Thuere C, Zenclussen ML, Schumacher A, Langwisch S, Schulte-Wrede U, Teles A, Paeschke S, Volk HD, Zenclussen AC (2007) Kinetics of regulatory T cells during murine pregnancy. *Am J Reprod Immunol*; 58: 514-523.
- 174) Zoller AL, Schnell FJ, Kersh GJ (2007) Murine pregnancy leads to reduced proliferation of maternal thymocytes and decreased thymic emigration. *Immunology*; 121: 207-215.
- 175) Chambers SP, Clarke AG (1979) Measurement of thymus weight, lumbar node weight and progesterone levels in syngeneically pregnant, allogeneically pregnant, and pseudopregnant mice. *J Reprod Fertil*; 55: 309-315.
- 176) Maroni ES, de Sousa MA (1973) The lymphoid organs during pregnancy in the mouse. A comparison between a syngeneic and an allogeneic mating. *Clin Exp Immunol*; 13: 107-124.
- 177) Beer AE, Billingham RE (1971) Immunobiology of mammalian reproduction. *Adv Immunol*; 14: 1-84.

- 178) Zhao JX, Zeng YY, Liu Y (2007) Fetal alloantigen is responsible for the expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cells pool during pregnancy. *J Reprod Immunol*; 75: 71-81.
- 179) Tai P, Wang J, Jin H, Song X, Yan J, Kang Y, Zhao L, An X, Du X, Chen X, Wang S, Xia G, Wang B (2008) Induction of regulatory T cells by physiological levels estrogen. *J Cell Physiol*; 214: 456-464.
- 180) Baratelli F, Krysan K, Heuze-Vourch N, Zhu L, Escudero B, Sharma S, Reckamp K, Dohadwala M, Dubinett SM (2005) PGE2 confers survivin-dependent apoptosis resistance in human monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol*; 78: 555-564.
- 181) Kirby DR, Billington WD, Bradbury S, Goldstein DJ (1964) Antigen Barrier of the Mouse Placenta. *Nature*; 204: 548-559.
- 182) Billington WD (1992) The normal fetomaternal immune relationship. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*; 6: 417-438.
- 183) Andrassy J, Kusaka S, Jankowska-Gan E, Torrealba JR, Haynes LD, Marthaler BR, Tam RC, Illigens BM, Anosova N, Benichou G, Burlingham WJ (2003) Tolerance to noninherited maternal MHC antigens in mice. *J Immunol*; 171: 5554-5561.
- 184) Nelson JL, Furst DE, Maloney S, Gooley T, Evans PC, Smith A, Bean MA, Ober C, Bianchi DW (1998) Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma. *Lancet*; 351: 559-562.
- 185) Mjösberg J, Berg G, Ernerudh J, Ekerfelt C (2007) CD4+CD25+ regulatory T cells in human pregnancy: development of a Treg-MLC-ELISPOT suppression assay and indications of paternal specific Tregs. *Immunology*; 120: 456-466.
- 186) Mold JE, Michaelsson J, Burt TD, Muench MO, Beckerman KP, Busch MP, Lee TH, Nixon DF, McCune JM (2008) Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science*; 322: 1562-1565.
- 187) Chaouat G, Kiger N, Wegmann T (1983) Vaccination against spontaneous abortion in mice. *J Reprod Immunol*; 5: 389-392.

- 188) Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, Ritschel S, Zambon Bertoja A, Fest S, Hontsu S, Ueha S, Matsushima K, Leber J, Volk HD (2006) Regulatory T cells induce a privileged tolerant microenvironment at the fetal-maternal interface. *Eur J Immunol*; 36: 82-94.
- 189) Jin LP, Li DJ, Zhang JP, Wang MY, Zhu XY, Zhu Y, Meng Y, Yuan MM (2004) Adoptive transfer of paternal antigen-hyporesponsive T cells induces maternal tolerance to the allogeneic fetus in abortion-prone matings. *J Immunol*; 173: 3612-3619.
- 190) Zhou WH, Dong L, Du MR, Zhu XY, Li DJ (2008) Cyclosporin A improves murine pregnancy outcome in abortion-prone matings: involvement of CD80/86 and CD28/CTLA-4. *Reproduction*; 135: 385-395.
- 191) Miranda S, Litwin S, Barrientos G, Szereday L, Chuluyan E, Bartho JS, Arck PC, Blois SM (2006) Dendritic cells therapy confers a protective microenvironment in murine pregnancy. *Scand J Immunol*; 64: 493-499.
- 192) Wafula PO, Teles A, Schumacher A, Pohl K, Yagita H, Volk HD, Zenclussen AC (2009) PD-1 but not CTLA-4 blockage abrogates the protective effect of regulatory T cells in a pregnancy murine model. *Am J Reprod Immunol*; 62: 283-292.
- 193) Read S, Greenwald R, Izcue A, Robinson N, Mandelbrot D, Francisco L, Sharpe AH, Powrie F (2006) Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo. *J Immunol*; 177: 4376-4383.
- 194) Guleria I, Khosroshahi A, Ansari MJ, Habicht A, Azuma M, Yagita H, Noelle RJ, Coyle A, Mellor AL, Khoury SJ, Sayegh MH (2005) A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance. *J Exp Med*; 202: 231-237.
- 195) Yang Y, Huang CT, Huang X, Pardoll DM (2004) Persistent Toll-like receptor signals are required for reversal of regulatory T cell-mediated CD8 tolerance. *Nat Immunol*; 5: 508-515.
- 196) Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, Ivars F (2006) Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology*; 118: 240-249.

- 197) Gari G, Piconese S, Frossi B, Manfroi V, Merluzzi S, Tripodo C, Viola A, Odom S, Rivera J, Colombo MP, Pucillo CE (2008) CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cells degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. *Immunity*; 29: 771-781.
- 198) Vigano P, Somigliana E, Mangioni S, Vignali M, Vignali M, Di Blasio AM (2002) Expression of interleukin-10 and its receptor is up-regulated in early pregnant versus cycling human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*; 87: 5730-5736.
- 199) Inagaki N, Stern C, McBain J, Lopata A, Kornman L, Wilkinson D (2003) Analysis of intra-uterine cytokine concentration and matrix-metalloproteinase activity in women with recurrent failed embryo transfer. *Hum Reprod*; 18: 608-615.
- 200) Pierce J, Parsons TF (1981) Glycoprotein hormones: structure, function. *Annu Rev Biochem*; 50: 465-495.
- 201) Policastro PF, Daniels-McQueen S, Carle G, Boime I (1986) A map of the hCG beta-LH beta gene cluster. *J Biol Chem*; 261: 5907-5916.
- 202) Bo M, Boime I (1992) Identification of the transcriptionally active genes of the chorionic gonadotropin beta gene cluster in vivo. *J Biol Chem*; 267: 3179-3184.
- 203) Hallast P, Rull K, Laan M (2007) The evolution and genomic landscape of CGB1 and CGB2 genes. *Mol Cell Endocrinol*; 260-262: 2-11.
- 204) Bellet D, Lazar V, Bieche I, Paradis V, Giovangrandi Y, Paterlini P, Lidereau R, Bedossa P, Bidart JM, Vidaud M (1997) Malignant transformation of nontrophoblastic cells is associated with the expression of chorionic gonadotropin beta genes normally transcribed in trophoblastic cells. *Cancer Res*; 57: 516-523.
- 205) Hotakainen K, Lintula S, Jarvinen R, Paju A, Stenman J, Rintala E, Stenman UH (2007) Overexpression of human chorionic gonadotropin beta genes 3, 5 and 8 in tumor tissue and urinary cells of bladder cancer patients. *Tumour Biol*; 28: 52-56.
- 206) Boorstein WR, Vamvakopoulos NC, Fiddes JC (1982) Human chorionic gonadotropin β -subunit is encoded by at least eight genes arranged in tandem, inverted pairs. *Nature*; 300: 419-422.

- 207) Policastro P, Ovitt CE, Hoshina M, Fukuoka H, Boothby MR, Boime I (1983) The β -subunit of human chorionic gonadotropin is encoded by multiple genes. *J Biol Chem*; 258: 11492-11499.
- 208) Morgan FJ, Birken S, Canfield RE (1975) The amino acid sequence of human chorionic gonadotropin. The alpha subunit, beta subunit. *J Biol Chem*; 250: 5247-5258.
- 209) Tepper MA, Roberts JL (1984) Evidence for only one β -luteinizing hormone, no β -chorionic gonadotropin gene in the rat. *Endocrinology*; 115: 385-391.
- 210) Crawford RJ, Tregear GW, Niall HD (1986) The nucleotide sequences of baboon chorionic gonadotropin beta-subunit genes have diverged from the human. *Gene*; 46: 161-169.
- 211) Carr FE, Chin WW (1985) Absence of detectable chorionic gonadotropin mRNAs in rat placenta during gestation. *Endocrinology*; 116: 1151-1157.
- 212) Juriscova A, Antenos M, Kapasi K, Meriano J, Casper RF (1999) Variability in the expression of trophoectodermal markers beta-human chorionic gonadotropin, human leukocyte antigen-G and pregnancy specific beta-1 glycoprotein by the human blastocyst. *Hum Reprod*; 14: 1852-1858.
- 213) Bonduelle ML, Dodd R, Liebaers I, van Steirteghem A, Williamson R, Akhurst R (1988) Chorionic gonadotropin-beta mRNA, a trophoblast marker, is expressed in human 8-cell embryos derived from tripronucleate zygotes. *Hum Reprod*; 3: 909-914.
- 214) Lopata A, Hay DL (1989) The potential of early human embryos to form blastocysts, hatch from their zona and secrete HCG in culture. *Hum Reprod*; 4: 87-94.
- 215) Hoshina M, Boothby M, Hussa R, Pattillo R, Camel HM, Boime I (1985) Linkage of human chorionic gonadotropin and placental lactogen biosynthesis to trophoblast differentiation and tumorigenesis. *Placenta*; 6: 163-172.
- 216) Pittaway DE, Reish RL, Wentz AC (1985) Doubling times of human chorionic gonadotropin increase in early viable intrauterine pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*; 152: 299-302.

- 217) Aspillaga MO, Whittaker PG, Taylor A, Lind T (1983) Some new aspects of the endocrinological response to pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*; 90: 596-603.
- 218) Braunstein GD, Rasor J, Adler D, Danza H, Wade MF (1976) Serum human chorionic gonadotrophin levels throughout normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*; 126: 678-681.
- 219) Jaffe RB, Lee PA, Midgley ARJ (1969) Serum gonadotropins before, at the inception of, following human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*; 29: 1281-1283.
- 220) Khodr GS, Siler-Khodr TM (1978) The effect of luteinizing hormone releasing factor on human chorionic gonadotropin secretion. *Fertil Steril*; 30: 301-304.
- 221) Ritvos O, Jalkanen J, Pekonen F, Stenman UH, Ranta T (1988) Epidermal growth factor but not insulin-like growth factor-I potentiates adenosine 3', 5'-monophosphate-mediated chorionic gonadotropin secretion by cultured human choriocarcinoma cells. *Endocrinology*; 123: 859-865.
- 222) Matsuzaki N, Li Y, Masuhiro K, Jo T, Shimoya K, Taniguchi T, Saji F, Tanizawa O (1992) Trophoblast-derived transforming growth factor β 1 suppresses cytokine-induced, but not gonadotropin-releasing hormone induced, release of human chorionic gonadotropin by normal human trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab*; 74: 211-216.
- 223) Ringler GE, Strauss JF (1990) In vitro systems for the study of human placental endocrine function. *Endocr Rev*; 11: 105-123.
- 224) Ahmed NA, Pearson Murphy BE (1988) The effects of various hormones on human chorionic gonadotropin production in early, late placental explant cultures. *Am J Obstet Gynecol*; 159: 1220-1227.
- 225) Srisuparp S, Strakova Z, Brudney A, Mukherjee S, Reierstad S, Hunzicker-Dunn M, Fazleabas AT (2003) Signal transduction pathways activated by chorionic gonadotropin in the primate endometrial epithelial cells. *Biol Reprod*; 68: 457-464.

- 226) Kane N, Kelly R, Saunders PT, Critchley HO (2009) Proliferation of uterine natural killer cells is induced by human chorionic gonadotropin and mediated via the mannose receptor. *Endocrinology*; 150: 2882-2888.
- 227) Reshef E, Lei ZM, Rao CV, Pridham DD, Chegini N, Luborsky JL (1990) The presence of gonadotropin receptors in nonpregnant human uterus, human placenta, fetal membranes, and decidua. *J Clin Endocrinol Metab*; 70: 421-430.
- 228) Keay SD, Vatish M, Karteris E, Hillhouse EW, Randeve HS (2004) The role of hCG in reproductive medicine. *BJOG*; 111: 1218-1228.
- 229) Fluhr H, Bischof-Islami D, Krenzer S, Licht P, Bischof P, Zygmunt M (2008a) Human chorionic gonadotropin stimulates matrix metalloproteinases-2 and -9 in cytotrophoblastic cells and decreases tissue inhibitor of metalloproteinases-1, -2 and -3 in decidualized endometrial stromal cells. *Fertil Steril*; 90: 1390-1395.
- 230) Horiuchi A, Nikaido T, Yoshizawa T, Itoh K, Kobayashi Y, Toki T, Konishi I, Fujii S (2000) HCG promotes proliferation of uterine leiomyoma cells more strongly than that of myometrial smooth muscle cells in vitro. *Mol Hum Reprod*; 6: 523-528.
- 231) Kornyei JL, Lei ZM, Rao CV (1993) Human myometrial smooth muscle cells are novel targets of direct regulation by human chorionic gonadotropin. *Biol Reprod*; 49: 1149-1157.
- 232) Lee TK, Kim DI, Song YL, Lee YC, Kim HM, Kim CH (2004) Differential inhibition of *Scutellaria barbata* D. Don (Lamiaceae) on HCG-promoted proliferation of cultured uterine leiomyoma and myometrial smooth muscle cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol*; 26: 329-342.
- 233) Gutman G, Barak V, Maslovitz S, Amit A, Lessing JB, Geva E (2008) Regulation of vascular endothelial growth factor-A and its soluble receptor sFlt-1 by luteinizing hormone in vivo: implications for ovarian follicle angiogenesis. *Fertil Steril*; 89: 922-926.
- 234) Berndt S, Perrier d'Hauterive S, Blacher S, Pequeux C, Lorquet S, Munaut C, Applanat M, Herve MA, Lamande N, Corvol P, van den Brule, Frankenne F, Poutanen M, Huhtaniemi I, Geenen V, Noel A, Foidart JM (2006) Angiogenic activity of human chorionic gonadotropin through

- LH receptor activation on endothelial and epithelial cells of the endometrium. *FASEB J*; 20: 2630-2632.
- 235) Zygmunt M, Herr F, Keller-Schoenwetter S, Kunzi-Rapp K, Munstedt K, Rao CV, Lang U, Preissner KT (2002) Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor. *J Clin Endocrinol Metab*; 87: 5290-5296.
- 236) Fujimoto A, Osuga Y, Fujiwara T, Yano T, Tsutsumi O, Momoeda M, Kugu K, Koga K, Morita Y, Wada O, Taketani Y (2002) Human chorionic gonadotropin combined with progesterone for luteal support improves pregnancy rate in patients with low late-midluteal estradiol levels in IVF cycles. *J Assist Reprod Genet*; 19: 550-554.
- 237) Humaidan P, Bungum L, Bungum M, Yding Andersen C (2006) Rescue of corpus luteum function with peri-ovulatory HCG supplementation in IVF/ICSI GnRH antagonist cycles in which ovulation was triggered with a GnRH agonist: a pilot study. *Reprod Biomed Online*; 13: 173-178.
- 238) Fatemi HM, Popovic-Todorovic B, Papanikolaou E, Donoso P, Devroey (2007) An update of luteal phase support in stimulated IVF cycles. *Hum Reprod Update*; 13: 581-590.
- 239) Perrier d'Hauterive S, Berndt S, Tsampalas M, Charlet-Renard C, Dubois M, Bourgain C, Hazout A, Foidart JM, Geenen V (2007) Dialogue between blastocyst hCG and endometrial LH/hCG receptor: which role in implantation? *Gynecol Obstet Invest*; 64: 156-160.
- 240) Khan NA, Khan A, Savelkoul HF, Benner R (2001) Inhibition of diabetes in NOD mice by human pregnancy factor. *Hum Immunol*; 62: 1315-1323.
- 241) Dong M, Ding G, Zhou J, Wang H, Zhao Y, Huang H (2008) The effect of trophoblasts on T lymphocytes: possible regulatory effector molecules-a proteomic analysis. *Cell Physiol Biochem*; 21: 463-472.
- 242) Kaye MD, Jones WR (1971) Effect of human chorionic gonadotropin on in vitro lymphocyte transformation. *Am J Obstet Gynecol*; 109: 1029-1031.

- 244) Han T (1974) Inhibitory effect of human chorionic gonadotropin on lymphocyte blastogenic response to mitogen, antigen and allogeneic cells. *Clin Exp Immunol*; 18: 529-535.
- 245) Hammarström L, Fuchs T, Smith CI (1979) The immunodepressive effect of human glucoproteins and their possible role in the nonrejection process during pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand*; 58: 417-422.
- 246) Fuchs T, Hammarström L, Smith CI, Brundin J (1980) In vitro induction of murine suppressor T cells by chorionic gonadotropin. *Acta Obstet Gynecol Scand*; 59: 355-359.
- 247) Kayisli UA, Selam B, Guzeloglu-Kayisli O, Demir R, Arici A (2003) Human chorionic gonadotropin contributes to maternal immunotolerance and endometrial apoptosis by regulating Fas-Fas ligand system. *J Immunol*; 171: 2305-2313.
- 248) Wan H, Versnel MA, Cheung WY, Leenen PJ, Khan NA, Benner R, Kiekens RC (2007) Chorionic gonadotropin can enhance innate immunity by stimulating macrophage function. *J Leukoc Biol*; 82: 926-933.
- 249) Wan H, Versnel MA, Leitjen LM, van Helden-Meeuwswen CG, Fekes D, Leenen PJ, Khan NA, Benner R, Kiekens RC (2008) Chorionic gonadotropin induces dendritic cells to express a tolerogenic phenotype. *J Leukoc Biol*; 83: 894-901.
- 250) Lin J, Lojun S, Lei ZM, Wu WX, Peiner SC, Rao CV (1995) Lymphocytes from pregnant women express human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor gene. *Mol Cell Endocrinol*; 111: 13-17.
- 251) Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY (2005) Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3. *Immunity*; 22: 329-341.
- 252) Hirota Y, Osuga Y, Koga K, Yoshino O, Hirata T, Morimoto C, Harada M, Takemura Y, Nose E, Yano T, Tsutsumi O, Taketani Y (2006) The expression and possible roles of chemokine CXCL11 and its receptor CXCR3 in the human endometrium. *J Immunol*; 177: 8813-8821.

- 253) Blois SM, Alba Soto CD, Tometten M, Klapp BF, Margni RA, Arck PC (2004) Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy. *Biol Reprod*; 70: 1018-1023.
- 254) Lottspeich F, Zorbas H (1998) *Lehrbuch der Bioanalytik*; Spektrum Verlag.
- 255) Arruvito L, Sanz M, Banham AH, Fainboim L (2007) Expansion of CD4+CD25+ and Foxp3+ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction. *J Immunol*; 178: 2572-2578.
- 256) Robertson SA, Ingman WV, O'Leary S, Sharkey DJ, Tremellen KP (2002) Transforming growth factor beta - a mediator of immune deviation in seminal plasma. *J Reprod Immunol*; 57: 109-128.
- 257) Peng Y, Laouar Y, Li MO, Green EA, Flavell RA (2004) TGF-beta regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells responsible for protection against diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*; 101: 4572-4577.
- 258) Yuen BH, Livingston JE, Poland BJ, Wittmann BK, Sy L, Cannon W (1981) Human chorionic gonadotropin, estradiol, progesterone, prolactin, and B-scan ultrasound monitoring of complications in early pregnancy. *Obstet Gynecol*; 57: 207-214.
- 259) Henderson DJ, Bennett PR, Moore GE (1992) Expression of human chorionic gonadotropin and subunits is depressed in trophoblasts from pregnancies with early embryonic failure. *Hum Reprod*; 7: 1474-1478.
- 260) Khil LY, Jun HS, Kwon H, Yoo JK, Kim S, Notkins L, Yoon JW (2007) Human chorionic gonadotropin is an immune modulator and can prevent autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetologie*; 50: 2147-2155.
- 261) Reichardt P, Gunzer F, Gunzer M (2007) Analyzing the physiodynamics of immune cells in a three-dimensional collagen matrix. *Methods Mol Biol*; 380: 253-269.

- 262) Kagami S, Saeki H, Komine M, Kakinuma T, Tsunemi Y, Nakamura K, Sasaki K, Asahina A, Tamaki K (2005) Interleukin-4 and Interleukin-13 enhance CCL26 production in a human keratinocyte cell line, HaCat cells. *Clin Exp Immunol*; 141: 459-466.
- 263) Kagami S, Saeki H, Komine M, Kakinuma T, Nakamura K, Tsunemi Y, Sasaki A, Asahina A, Tamaki K (2006) CCL28 production in HaCat cells was mediated by different signal pathways from CCL27. *Exp Dermatol*; 15: 96-100.
- 264) Saeki H, Tamaki K (2006) Thymus and activation regulated chemokine (TARC)/CCL17 and skin diseases. *J Dermatol Sci*; 43: 75-84.
- 265) Scholz F, Schulte A, Adamski A, Hundhausen C, Mittag J, Schwarz A, Kruse ML, Proksch E, Ludwig A (2007) Constitutive expression and regulated release of the transmembrane chemokine CXCL16 in human and murine skin. *J Invest Dermatol*; 127: 1444-1455.
- 266) Bulmer JN, Johnson PM (1986) The T-lymphocyte population in first trimester human decidua does not express the interleukin-2 receptor. *Immunology*; 58: 685-687.
- 267) Athanassakis I, Iconomidou B (1996) Cytokine production in the serum and spleen of mice from day 6 to 14 of gestation: cytokines/placenta/spleen/serum. *Dev Immunol*; 4: 247-255.
- 268) Zhu XY, Zhou YH, Wang MY, Jin LP, Yuan MM, Li DJ (2005) Blockade of CD86 signaling facilitates a Th2 bias at the maternal-fetal interface and expands peripheral CD4+CD25+ regulatory T cells to rescue abortion-prone fetuses. *Biol Reprod*; 72: 338-345.
- 269) Segerer SE, Müller N, van den Brandt J, Kapp M, Dietl J, Reichardt HM, Rieger L, Kämmerer U (2009) Impact of female sex hormones on the maturation and function of human dendritic cells. *Am J Reprod Immunol*; 62: 165-173.
- 270) Fuchs T, Hammarström L, Smith CI, Brundin J (1981) In vitro induction of human suppressor T cells by chorionic gonadotropin preparation. *J Reprod Immunol*; 3: 75-84.
- 271) Polanczyk MJ, Carson BD, Subramanian S, Afentoulis M, Vandenbark AA, Ziegler SF, Offner H (2004) Cutting edge: Estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment. *J Immunol*; 173: 2227-2230.

- 272) Robertson SA, Guerin LR, Bromfield JJ, Branson KM, Ahlström AC, Care AS (2009) Seminal fluid drives expansion of the CD4+CD25+ T regulatory cells pool and induces tolerance to paternal alloantigens in mice. *Biol Reprod*; 80: 1036-1045.
- 273) Kallikourdis M, Betz AG (2007) Periodic accumulation of regulatory T cells in the uterus: preparation for the implantation of a semi-allogeneic fetus? *PLoS ONE*; 2: 382.
- 274) Prieto GA, Rosenstein Y (2006) Oestradiol potentiates the suppressive function of human CD4+CD25+ regulatory T cells by promoting their proliferation. *Immunology*; 118: 58-65.
- 275) Trowsdale J, Betz AG (2006) Mother's little helpers: mechanisms of maternal fetal tolerance. *Nat Immunol*; 7: 241-246.
- 276) Guleria I, Sayegh MH (2007) Maternal acceptance of the fetus: true human tolerance. *J Immunol*; 178: 3345-3351.
- 277) Kallikourdis M, Andersen KG, Welch KA, Betz AG (2007) Alloantigen-enhanced accumulation of CCR5+ effector regulatory T cells in the gravid uterus. *Proc Natl Acad Sci USA*; 104: 594-599.
- 278) Darasse-Jéze G, Klatzmann D, Charlotte F, Salomon BL, Cohen JL (2006) CD4+CD25+ regulatory/suppressor T cells prevent allogeneic fetus rejection in mice. *Immunol Lett*; 102: 106-109.
- 279) Robertson SA, Sharkey DJ (2001) The role of semen in induction of maternal immune tolerance to pregnancy. *Semin Immunol*; 13: 243-254.
- 280) Redline RW, Lu CY (1989) Localization of fetal major histocompatibility complex antigens and maternal leukocytes in murine placenta. Implications for maternal-fetal immunological relationship. *Lab Invest*; 61: 27-36.
- 281) Jaffe L, Robertson EJ, Bikoff EK (1991) Distinct patterns of expression of MHC class I and beta 2-microglobulin transcripts at early stages of mouse development. *J Immunol*; 147: 2740-2749.

- 282) Gangnuss S, Sutton-McDowall ML, Robertson SA, Armstrong DT (2004) Seminal plasma regulates corpora lutea macrophage populations during early pregnancy in mice. *Biol Reprod*; 71: 1135-1141.
- 283) Beer AR, Billingham RE (1974) Host responses to intra-uterine tissue, cellular and fetal allografts. *J Reprod Fertil Suppl*; 21: 59-88.
- 284) Piazzon I, Matusevich M, Deroche A, Nepomnaschy I, Pasqualini CD (1985) Early increase in graft-versus-host reactivity during pregnancy in the mouse. *J Reprod Immunol*; 8: 129-137.
- 285) Johansson M, Bromfield JJ, Jasper MJ, Robertson SA (2004) Semen activates the female immune response during early pregnancy in mice. *Immunology*; 112: 290-300.
- 286) Robertson SA (2007) Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: lessons from rodents and pigs. *J Anim Sci*; 85: 36-44.
- 287) Robertson SA, Mau VJ, Tremellen KP, Seamark RF (1996) Role of high molecular weight seminal vesicle proteins in eliciting the uterine inflammatory response to semen in mice. *J Reprod Fertil*; 107: 265-277.
- 288) McMaster MT, Newton RC, Dey SK, Andrews GK (1992) Activation and distribution of inflammatory cells in the mouse uterus during preimplantation period. *J Immunol*; 148: 1699-1705.
- 289) Robertson SA, Allanson M, Mau VJ (1998) Molecular regulation of uterine leukocyte recruitment during early pregnancy in the mouse. *Troph Research*; 11: 101-120.
- 290) Blois SM, Kammerer U, Alba Soto CD, Tometten MC, Shaikly V, Barrientos G, Jurd R, Rukavina D, Thompson AW, Klapp BF, Fernandez N, Arck PC (2007) Dendritic cells: key to fetal tolerance? *Biol Reprod*; 77: 590-598.
- 291) Aumüller G, Riva A (1992) Morphology and functions of the human seminal vesicle. *Andrologia*; 24: 183-196.

- 292) Maegawa M, Kamada M, Irahara M, Yamamoto S, Yoshikawa S, Kasai Y, Ohmoto Y, Gima H, Thaler CJ, Aono T (2002) A repertoire of cytokines in human seminal plasma. *J Reprod Immunol*; 54: 33-42.
- 293) Casslen BG, Harper MJ (1991) Human endometrial epithelial cells grown on collagen in serum-free medium. Estrogen responsiveness and morphology. *Acta Endocrinol*; 125: 101-108.
- 294) Witkin SS (1986) Selective activation of functional suppressor cells by human seminal fluid. *Clin Exp Immunol*; 64: 364-369.
- 295) Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, Parcellier A, Schmitt E, Solary E, Kroemer G, Martin F, Chauffert B, Zitvogel L (2005b) Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med*; 202: 919-929.
- 296) Baratelli F, Lin Y, Zhu L, Yang SC, Heuze-Vourch N, Zeng G, Reckamp K, Dohadwala M, Sharma S, Dubinett SM (2005) Prostaglandin E2 induces Foxp3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4+ T cells. *J Immunol*; 175: 1483-1490.
- 297) Thompson JG, Kind KL, Roberts CT, Robertson SA, Robinson JS (2002) Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: short- and long-term consequences for the health of children conceived through assisted reproductive technology: more reason for caution?. *Hum Reprod*; 17: 2783-2786.
- 298) Watson JG, Carroll J, Chaykin S (1983) Reproduction in mice: the fate of spermatozoa not involved in fertilization. *Gamete Res*; 7: 75-84.
- 299) Bromfield JJ, Roberts CT, Robertson SA (2004) Seminal plasma programs uterine receptivity and pregnancy outcome. *Biol Reprod. Abstracts of the 37th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction*; Vancouver, Canada.
- 300) Carp HJ, Serr DM, Mashiach S, Nebel L (1984) Influence of insemination on the implantation of transferred rat blastocysts. *Gynecol Obstet Invest*; 18: 194-198.

- 301) Bellinge BS, Copeland CM, Thomas TD, Mazzucchelli RE, O'Neil G, Cohen MJ (1986) The influence of patient insemination on the implantation rate in an in vitro fertilization and embryo transfer program. *Fertil Steril* ; 46: 2523-2526.
- 302) Tremellen KP, Valbuena D, Landeras J, Ballesteros A, Martinez J, Mendoza S, Norman RJ, Robertson SA, Simon C (2000) The effect of intercourse on pregnancy rates during assisted human reproduction. *Hum Reprod*; 15: 2653-2658.
- 303) Coulam CB, Stern JJ (1995) Effect of seminal plasma on implantation rates. *Early Pregnancy*; 1: 33-36.
- 304) Saito S, Sakai M (2003) Th1/Th2 balance in preeclampsia. *J Reprod Immunol*; 59: 161-173.
- 305) Klonoff-Cohen HS, Savitz DA, Celafo RC, McCann MF (1989) An epidemiologic study of contraception and preeclampsia. *JAMA*; 262: 3143-3147.
- 306) Robillard PY, Hulsey TC, Perianin J, Janky E, Miri EH, Papiernik E (1995) Association of pregnancy-induced hypertension with duration of sexual cohabitation before conception. *Lancet*; 344: 973-975.
- 307) Salha O, Sharma V, Dada T, Nugent D, Rutherford AJ, Tomlinson AJ, Philips S, Allgar V, Walker JJ (1999) The influence of donated gametes on the incidence of hypertensive disorders of pregnancy. *Hum Reprod*; 14: 2268-2273.
- 308) Hernández-Valencia M, Saldana Quezada L, Alvarez-Munoz M, Valdez Martinez E (2000) Barrier family planning methods as risk factor which predisposes to preeclampsia. *Ginecol Obstet Mex*; 68: 333-338.
- 309) Perrier d'Hauterive S, Charlet-Renard C, Berndt S, Dubois M, Munaut C, Goffin F, Hagelstein MT, Noel A, Hazout A, Foidart JM, Geenen V (2004) Human chorionic gonadotropin and growth factors at the embryonic-endometrial interface control leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin 6 (IL-6) secretion by human endometrial epithelium. *Hum Reprod*; 19: 2633-2643.

- 310) Licht P, Fluhr H, Neuwinger J, Wallwiener D, Wildt L (2007) Is human chorionic gonadotropin directly involved in the regulation of human implantation? *Mol Cell Endocrinol*; 269: 85-92.
- 311) Tang B, Gurside E (1993) Direct effects of gonadotropins on decidualization of human endometrial stroma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 47: 115-121.
- 312) Yoshioka S, Fujiwara H, Nakayama T, Kosaka K, Mori T, Fujii S (2006) Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells promotes implantations rates in patients with repeated failure of IVF-embryo transfer. *Hum Reprod*; 21: 3290-3294.
- 313) Nagaeva O, Jonsson L, Mincheva-Nilsson L (2002) Dominant IL-10 and TGF-beta mRNA expression in T cells of human early pregnancy decidua suggests immunoregulatory potential. *Am J Reprod Immunol*; 48: 9-17.
- 314) Moussa M, Mognetti N, Dubanchet S, Menu E, Roques P, Dormont D, Barre-Sinoussi F, Chaouat G (2001) Expression of chemokines in explants and trophoblasts from early and term human placentae. *Am J Reprod Immunol*; 46: 309-317.
- 315) Ishii M, Hayakawa S, Suzuki MK, Yoshino N, Honda M, Nishinarita S, Chishima F, Nagaishi M, Satoh K (2000) Expression of functional chemokine receptors of human placental cells. *Am J Reprod Immunol*; 44: 365-373.
- 316) Hannan NJ, Jones RL, White CA, Salamonsen LA (2006) The chemokines CXCL1, CCL14, and CCL4, promote human trophoblast migration at the feto-maternal interface. *Biol Reprod*; 74: 896-904.
- 317) Huang Y, Zhu XY, Du MR, Li DJ (2008) Human trophoblasts recruited T lymphocytes and monocytes into decidua by secretion of chemokine CXCL16 and interaction with CXCR6 in the first-trimester pregnancy. *J Immunol*; 180: 2367-2375.
- 318) Moyle WR, Myers RV, Wang Y, Han Y, Lin W, Kelley GL, Ehrlich PH, Rao SV, Bernard MP (1998) Functional homodimeric glycoprotein hormones: Implications for hormone action and evolution. *Chem Biol*; 5: 241-254.

- 319) Lobel L, Pollack S, Wang S, Chaney M, Lustbader JW (1999) Expression and characterization of recombinant beta-subunit hCG homodimer. *Endocrine*; 10: 261-270.
- 320) Butler SA, Iles RK (2004) The free monomeric beta subunit of human chorionic gonadotropin (hCG- β) and the recently identified homodimeric betabeta subunit (hCGB/ β) both have auto-crine growth effects. *Tumour Biol*; 25: 18-23.
- 321) Krause JM, Berger P, Roig J, Singh V, Merz WE (2007) Rapid maturation of glycoprotein hormone free alpha-subunit (GPHalpha) and GPHalphaalpha homodimers. *Mol Endocrinol*; 21: 2551-2564.
- 322) Ashkar AA, Croy BA (1999) Interferon- γ contributes to the normalcy of murine pregnancy. *Biol Reprod*; 61: 493-502.
- 323) Simon C, Mercader A, Gimeno MJ, Pellicer A (1997) The interleukin-1 system and human implantation. *Am J Reprod Immunol*; 37: 64-72.
- 324) Makrigiannakis A, Minas V, Kalantaridou SN, Nikas G, Chrousos GP (2006) Hormonal and cytokine regulation of early implantation. *Trends Endocrinol Metab*; 17: 178-185.
- 325) Daya S, Clark DA, Devlin C, Jarrell J, Chaput A (1985) Suppressor cells in human decidua. *Am J Obstet Gynecol*; 151: 267-270.
- 326) Heikkinen J, Möttönen M, Alanen A, Lassila O (2004) Phenotypic characterization of regulatory T cells in human decidua. *Clin Exp Immunol*; 136: 373-378.
- 327) Chao KH, Wu MY, Yang JH, Chen SU, Yang YS, Ho HN (2007) Decreased expression of CD25 on decidual activated T lymphocytes is not mediated by reduced CD25 messenger ribonucleic acid. *Fertil Steril*; 87: 182-188.
- 328) Tilburgs T, Roelen DL, van der Mast BJ, van Schip JJ, Kleijburg C, de Groot-Swings GM, Kanhai HH, Claas FH, Scherjon SA (2006) Differential distribution of CD4+CD25bright and CD8+CD28+ T-cells in decidua and maternal blood during human pregnancy. *Placenta*; 27: 47-53.

- 329) Tilburgs T, Roelen DL, van der Mast BJ, de Groot-Swings GM, Kleijburg C, Scherjon SA, Claas FH (2008) Evidence for a selective migration of fetus-specific CD4+CD25bright regulatory T cells from the peripheral blood to the decidua in human pregnancy. *J Immunol*; 180: 5737-5745.
- 330) Yagel S, Geva TE, Solomon H, Shimonovitz S, Reich R, Finci-Yeheskel Z, Mayer M, Milwidsky A (1993) High levels of human chorionic gonadotropin retard first trimester trophoblast invasion in vitro by decreasing urokinase plasminogen activator and collagenase activities. *J Clin Endocrinol Metab*; 77: 1506-1511.
- 331) Han SW, Lei ZM, Rao CV (1996) Up-regulation of cyclooxygenase-2 gene expression by chorionic gonadotropin during differentiation of human endometrial stromal cells into decidua. *Endocrinology*; 137: 1791-1797.
- 332) Alexander H, Zimmermann G, Lehmann M, Pfeiffer R, Schöne E, Leiblein S, Ziegert M (1998) HCG secretion by peripheral mononuclear cells during pregnancy. *Domest Anim Endocrinol*; 15: 377-387.
- 333) Kosaka K, Fujiwara H, Tatsumi K, Yoshioka S, Sato Y, Egawa H, Higuchi T, Nakayama T, Ueda M, Maeda M, Fujii S (2002) Human chorionic gonadotropin (HCG) activates monocytes to produce interleukin-8 via a different pathway from luteinizing hormone/HCG receptor system. *J Clin Endocrinol Metab*; 87: 5199-5208.
- 334) Ushigoe K, Irahara M, Fukumochi M, Kamada M, Aono T (2000) Production and regulation of cytokine-induced neutrophil chemoattractant in rat ovulation. *Biol Reprod*; 63: 121-126.
- 335) Reinisch N, Sitte BA, Kähler CM, Wiedermann CJ (1994) Human chorionic gonadotropin: a chemoattractant for human blood monocytes, neutrophils and lymphocytes. *J Endocrinol*; 142: 167-170.
- 336) Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryzek I, Daniel B, Gordan A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W (2004) Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*; 10: 942-949.

- 337) Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, Jungbluth AA, Frosina D, Gnjjatic S, Ambrosone C, Kepner J, Odunsi T, Ritter G, Lele S, Chen YT, Ohtani H, Old LJ, Odunsi K (2005) Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favourable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*; 102: 18538-18543.
- 338) Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, Banham AH (2006) Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol*; 24: 5373-5380.
- 339) Lutz M, Schuler G (2002) Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol*; 23: 445-449.
- 340) Shortman K, Liu YJ (2002) Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*; 2: 151-161.
- 341) Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG (1996) Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med*; 184: 19-29.
- 342) Nonaka T, Takakuwa K, Ooki I, Akashi M, Yokoo T, Kikuchi A, Tanaka K (2007) Results of immunotherapy for patients with unexplained primary recurrent abortions - prospective non-randomized cohort study. *Am J Reprod Immunol*; 58: 530-536.
- 343) Yang H, Qiu L, Di W, Zhao A, Chen G, Hu K, Lin Q (2009) Proportional change of CD4+CD25+ regulatory T cells after lymphocyte therapy in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Fertil Steril*; 92: 301-305.

9 Anhang

Tab. 9: Die Progesteronkonzentration in den Weibchen stieg nach Verpaarung mit intakten und samenblasendefizienten Männchen an. Mittels ELISA wurde der Progesteron Gehalt im Blutplasma von CBA/J-Weibchen, die entweder mit intakten oder samenblasendefizienten BALB/c-Männchen verpaart wurden, an verschiedenen Schwangerschaftstagen bestimmt. Ein Anstieg der Progesteronkonzentration konnte sowohl nach Verpaarung mit intakten als auch mit samenblasendefizienten Männchen beobachtet werden und diente der Verifizierung einer bestehenden Schwangerschaft. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen angegeben.

Verpaarung	Tag der Schwangerschaft	N	Konz. Progesteron [ng/ml]
CBA/J (jungfräulich)	-	4	3,02±0,37
CBA/J x BALB/c (intakt)	0,5	4	3,38±1,93
	2	3	19,82±3,67
	5	4	19,10±1,93
CBA/J x BALB/c (samenblasendefizient)	0,5	6	4,64±2,91
	2	5	10,44±3,08
	5	6	12,98±2,99

Tab. 10: Das Fehlen von Spermien oder Samenblasenflüssigkeit hatte keinen Einfluss auf die Expansion der T_{reg}-Zellen im Blut *in vivo*. Mittels Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Anteil an CD4⁺Foxp3⁺- und Foxp3⁺-Zellen bezogen auf die gesamte Lymphozytenpopulation im Blut bestimmt. Vergleichbare Anteile an CD4⁺Foxp3⁺- und Foxp3⁺-Zellen konnten in allen Verpaarungsgruppen im Blut festgestellt werden. Die Daten sind als Mediane ^[Minimum/Maximum] dargestellt. Der paarweise Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney *U*-Test durchgeführt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Verpaarungsgruppen festgestellt werden.

Verpaarung	Tag der Schwangerschaft	N	CD4 ⁺ Foxp3 ⁺	N	Foxp3 ⁺
CBA/J (jungfräulich)	-	7	0,73 ^[0,42/2,08]	4	2,18 ^[0,84/6,54]
CBA/J x BALB/c (intakt)	0,5	4	0,96 ^[0,57/3,12]	4	2,55 ^[1,06/10,11]
	2	5	1,81 ^[0,50/2,01]	5	2,83 ^[2,50/3,42]
	5	4	0,95 ^[0,14/3,60]	3	2,91 ^[0,33/6,17]

CBA/J x BALB/c (samenblasendefizient)	0,5	6	1,72 ^[1,15/1,94]	6	2,37 ^[1,30/2,78]
	2	5	0,87 ^[0,42/3,63]	5	1,31 ^[0,46/6,95]
	5	6	1,56 ^[0,84/2,07]	6	1,60 ^[0,79/3,38]
CBA/J x BALB/c (vasektomiert)	0,5	4	1,46 ^[1,04/2,87]	4	1,48 ^[1,03/3,05]
	2	4	1,19 ^[0,64/2,66]	4	1,17 ^[0,63/2,11]
	5	4	1,03 ^[0,49/2,56]	4	1,13 ^[0,53/2,19]

Tab. 11: Das Fehlen von Spermien oder Samenblasenflüssigkeit hatte keinen Einfluss auf die Expansion der T_{reg}-Zellen in der Milz *in vivo*. Mittels Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Anteil an Foxp3⁺-Zellen bezogen auf die gesamte Lymphozytenpopulation in der Milz bestimmt. Vergleichbare Anteile an Foxp3⁺-Zellen konnten in allen Verpaarungsgruppen in der Milz festgestellt werden. Die Daten sind als Median^[Minimum/Maximum] dargestellt. Der paarweise Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Verpaarungsgruppen festgestellt werden.

Verpaarung	Tag der Schwangerschaft	N	Foxp3 ⁺
CBA/J (jungfräulich)	-	4	1,42 ^[0,77/1,96]
CBA/J x BALB/c (intakt)	0,5	5	1,37 ^[0,99/2,28]
	2	5	1,75 ^[1,45/1,98]
	5	5	2,17 ^[1,02/2,99]
CBA/J x BALB/c (samenblasendefizient)	0,5	6	1,73 ^[1,16/2,79]
	2	5	1,64 ^[1,54/2,61]
	5	6	1,49 ^[0,98/5,07]
CBA/J x BALB/c (vasektomiert)	0,5	4	1,17 ^[0,64/1,50]
	2	4	1,27 ^[0,94/1,97]
	5	4	0,84 ^[0,73/0,95]

Tab. 12: Primäre Trophoblasten und die Choriokarzinomzelllinie JEG-3 produzierten vergleichbare Mengen an hCG, wohingegen die Keratinozytzelllinie HaCat kein hCG bildete. Mittels ELISA wurde die Konzentration von hCG im Zellkulturüberstand nach 24 Stunden bestimmt. Vergleichbare hCG-Mengen konnten im Zellkulturüberstand der Primären Trophoblasten (30,35 IU/ L) und der JEG-3-Zellen (30,01 IU/ L) nachgewiesen werden. Kein hCG konnte dagegen im Zellkulturüberstand der HaCat-Zellen (0,08 IU/ ml) detektiert werden. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt.

Zelltyp	N	Konz.-hCG[IU/L]
JEG-3	15	30,01±9,91
Primäre Trophoblasten	5	30,35±5,15
HaCat	15	0,08±0,10

10 Danksagung

Mein allergrößter Dank geht an Frau Dr. Prof. Ana Zenclussen, die mir nach Fertigstellung meiner Diplomarbeit in ihrer Arbeitsgruppe weiterhin die Möglichkeit gegeben hat, an diesem interessanten Forschungsthema weiter zu arbeiten. Insbesondere möchte ich ihr dafür danken, dass sie mir immer großes Vertrauen entgegengebracht und mich auf meinem wissenschaftlichen Werdegang jederzeit begleitet und unterstützt hat. Darüber hinaus bin ich ihr dankbar, dass sie stets ein offenes Ohr für meine Probleme und Verständnis für meine persönlichen Anliegen hatte.

Ebenfalls danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Hans-Dieter Volk für die Betreuung meiner Doktorarbeit an der Humboldt-Universität zu Berlin. Seine Anmerkungen zu meiner Doktorarbeit haben dazu beigetragen, die vorliegende Arbeit zu verbessern.

Des Weiteren möchte ich allen weiteren Gutachtern und Mitgliedern des Promotionsausschusses danken, dass sie sich bereit erklärt haben, diese Aufgabe zu übernehmen.

Ein persönliches Dankeschön möchte ich auch an Dr. Sindy Sohr und Prof. Dr. Kurt Engeland aus Leipzig für die gute Zusammenarbeit richten.

Für die schöne Zeit und für seine unendliche Geduld möchte ich meinem Ehemann Joachim danken. Das sorgfältige Lesen meiner Arbeit und seine guten inhaltlichen Korrekturvorschläge haben die Arbeit bereichert und verbessert. Ich wünsche ihm von ganzem Herzen, dass er seine Doktorarbeit erfolgreich abschließt.

Ein ganz großes Dankeschön geht an alle Mitglieder meiner Familie. Insbesondere möchte ich an dieser Stelle meiner Oma Christel, meinem Opa Horst, meiner Mutter Kerstin und meiner Schwester Nora danken, die mich immer sowohl seelisch als auch finanziell in allen Lebenssituationen unterstützt haben. Meiner Oma Christel möchte ich zudem für das Korrekturlesen dieser Arbeit danken, ohne dass wohl so einige kleine Fehler übersehen worden wären.

Ein ganz liebes Dankeschön richtet sich an meine beiden Mitstreiterinnen und guten Freundinnen Nadja und Steffi, die zu jeder Zeit für alle meine Probleme immer ein offenes Ohr hatten und für die schöne Zeit außerhalb des Labors gesorgt haben. Darüber hinaus möchte ich Nadja danken, dass sie

sich die Zeit genommen hat die vorliegende Arbeit zu lesen. Ihre genauen Anmerkungen zu den Graphiken haben mir sehr geholfen, diese zu verbessern.

Des Weiteren danke ich allen weiteren Arbeitskollegen für ihre theoretische und praktische Unterstützung während der gesamten Doktorarbeitszeit und für die schönen Stunden innerhalb und außerhalb des Labors.

Abschließend möchte ich allen meinen Freunden aus Universitäts- und Schulzeiten für die schönen gemeinsamen Stunden danken.

11 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Doktorarbeit mit dem Titel „Untersuchungen zur Generierung, Migration und Funktion von Regulatorischen T-Zellen in der Schwangerschaft“ eigenständig verfasst habe und dass keine außer den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln verwendet wurden.

Anne Leber

